# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología

# TESIS DOCTORAL

## Estudio farmacocinético-farmacodinámico de la cefquinoma en cabras en función de la edad, la gestación y la lactancia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nicolás Javier Litterio

Directores

Manuel I. de San Andrés Larrea
Juan Carlos Boggio

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

# Estudio farmacocinético / farmacodinámico de la cefquinoma en cabras en función de la edad, la gestación y la lactancia

Nicolás Javier Litterio

Madrid, 2012

D. Manuel Ignacio de San Andrés Larrea, Profesor Titular de Farmacología, adscrito al Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y D. Juan Carlos Boggio, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (República Argentina),

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por el Veterinario D. Nicolás Javier Litterio, con el título "Estudio farmacocinético / farmacodinámico de la cefquinoma en cabras en función de la edad, la gestación y la lactancia", ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en los laboratorios y campos experimentales pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (República Argentina).

Madrid, septiembre de 2012

Fdo. Manuel I. de San Andrés Larrea

Fdo. Juan Carlos Boggio

Trabajo que presenta D. Nicolás Javier Litterio

para aspirar al título de Doctor

Fdo. Nicolás Javier Litterio

Madrid, septiembre 2012

**AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Complutense de Madrid, por darme la oportunidad de poder realizar este prestigioso Doctorado.

A la Universidad Católica de Córdoba, por darme el respaldo y espacio necesarios para realizar las actividades de investigación relacionadas a esta tesis, y por haberme concedido una beca de posgrado que ha colaborado con la ejecución de este Doctorado.

A los proyectos otorgados oportunamente por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo que me permitieron en su momento cubrir los gastos de traslados y estadía en Madrid.

Al Laboratorio Intervet, por colaborar con la cefquinoma pura para la realización de los estándaraes, así como los preparados comerciales del mismo fármaco.

A mi director Juan Carlos Boggio, mi amigo y guía, que me ha ayudado no sólo para que pudiera realizar este Doctorado, sino también para que en gran medida sea lo que soy actualmente como profesional y persona. En este momento querido Juan Carlos, Dios te ha puesto en una situación difícil de comprender, y me ha dado una posta que lleva tu nombre. Sólo espero ser digno de ella y repetir la historia con los que me suceden. Siento un enorme orgullo por vos, mi gran amigo… te aseguro que no te voy a desilusionar.

Al Dr. Manuel San Andrés Larrea, por su gran aporte como director, por su increíble apoyo, por estar siempre alentándome e impidiendo que me desmorone. Por permitirme ser su amigo. Otra de las grandes personas que marcan el surco de mi vida. Manolo, por eso te digo “Gran Manolo”, porque lo sos y por ende, un ejemplo a seguir.

Al Dr. Julio de Lucas, que apostó fuerte no sólo por mí, para que pudiera recorrer este camino del Doctorado, sino por todo un grupo de trabajo conformado por jóvenes investigadores de la Universidad Católica de Córdoba. Querido Julio, espero no decepcionarte.

A Mariló, Casida, Mariano y al resto de los integrantes de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Siempre que he estado junto a ellos, me han hecho olvidar lo lejos que estaba de mi país.

A las increíbles personas de mi Universidad Católica de Córdoba y que prácticamente han hecho este doctorado con migo. En lo sucesivo me referiré a ellos.

A los Médico Veterinarios Matías Lorenzutti, Martín Himelfarb y Pilar Zarazaga, de la Cátedra de Farmacología, por ayudarme en las etapas experimentales, tanto a campo

como en el laboratorio, por haberme cubierto con las actividades docentes, y tenerme tanta paciencia (sé que no es fácil).

A la Vet. Soledad Aguilar de la Cátedra de Clínica de Grandes Animales y responsable del Campo Experimental, por haberme ayudado en la selección de los animales, la sincronización de los servicios reproductivos, y las tomas de muestras fundamentalmente, en la etapa “a campo”.

A las Med. Vet Jordana Auad y Laura Cooper de la Cátedra de enfermedades infecciosas, por llevar a cabo la técnica para determinar la concentración inhibitoria mínima de la cefquinoma frente a patógenos aislados de leche caprina.

Al Med. Vet. Marcelo Priotto y Med. Vet. Carolina Ghersevich de la Cátedra de Cirugía, por las intervenciones cesáreas hechas en las cabras.

A la Dra. Marcela Palacio por la puesta a punto de la técnica analítica para cuantificar la cefquinoma en suero y leche.

Al Sr. Alfredo Mier por su enorme dedicación en la técnica cromatográfica para cuantificar la cefquinoma en suero y leche.

A los alumnos de la agrupación estudiantil Grupo Caprino, por colaborar con los muestreos farmacocinéticos.

A Manolo, Sonia, Manuel, Ignacio y Javier, por recibirme como a uno más de su familia. Si se piensa en la gente maravillosa de este mundo, ellos, sin dudas, constituyen un claro ejemplo.

Y mencionando a la familia, he dejado a lo último a la mía pues como se sabe, los últimos son los primeros. El amor que nos tenemos es increíble y se manifiesta en estos grandes esfuerzos de tolerancia. Y “agradecer” es una palabra que queda absolutamente pequeña cuando recuerdo los momentos que tuvieron que tolerarme sin que les prestara la atención que correspondía. Ana, Josefina y Julia, las amo mucho. Estas palabras, lo resumen todo.

Y lógicamente, al más grande de todos…. a DIOS.

*A mi esposa Ana*

*A mis hijas Josefina y Julia*

*A mi amigo Juan Carlos*

**CONTENIDOS**

# I.- REVISIÓN BIBLOGRÁFICA

# I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## I.1.- Introducción a la producción caprina

Los cápridos (*Capra* spp) son un género de mamíferos artiodáctilos de la familia *Bovidae* que suelen conocerse comúnmente como cabras, aunque existen animales de otros géneros (por ejemplo *Oreamnos* spp) que también se llaman así. La cabra o chiva (*Capra aegagrus hircus* o tradicionalmente *C. hircus*) fue domesticada desde hace unos 10.000 años (Ensminger Y Parker, 1986) siendo su distribución actual prácticamente cosmopolita, debido a su gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y a los distintos regímenes nutricionales en las que fueron desarrolladas y mantenidas posteriormente. Ellas resultaron útiles para el hombre a lo largo de los siglos debido a su productividad (alimentos y abrigo), tamaño pequeño, y a la no competitividad con él por los alimentos.

Debido a su adaptabilidad en sistemas ecológicos frágiles de zonas áridas o semiáridas con bajo contenido de materia orgánica y nutrientes, muy sueltos y salinos en muchas ocasiones, con alta radiación solar, un balance hídrico negativo y precipitaciones escasas estacionadas en el verano (Arias y Alonso, 2002) son una muy buena alternativa a la producción del otras especies rumiantes tales como la bovina u ovina. Éste es uno de los motivos por el que la producción caprina hace una contribución muy valiosa especialmente a las regiones en vías de desarrollo.

Si bien la producción mundial de ovinos y bovinos siguen siendo las preferentes, la correspondiente a la especie caprina en los últimos años (período comprendido entre el 2000 y 2010) se ha incrementado a una velocidad que supera la de los bovinos y fundamentalmente la de los ovinos, según se puede evidenciar en las pendientes de las líneas de tendencia de la figura 1 (FAOSTAT 2012). Asimismo se puede observar que las existencias caprinas a nivel mundial se han incrementado desde 7 millones en el año 2000 a 9,5 millones en el 2010, con una tasa promedio anual del 10 %.

El escenario en Argentina es similar a lo acontecido en otras partes del mundo, es decir las cabras son producidas en regiones, tales como las del centro y noroeste, donde la cría del tradicional bovino no es posible debido a que las condiciones geográficas y medioambientales no permiten cubrir por sí solas las necesidades nutricionales del ganado vacuno.

En Argentina, existen dos tipos de unidades productivas básicas o más comúnmente explotaciones agropecuarias (EAPs), las denominadas “tradicionales”, estrechamente asociadas a la economía doméstica, y las “modernas” que implican la cría intensiva de ganado caprino (Matta *et al*, 2007).

Las tradicionales son las que predominan y se caracterizan por ser unidades a cargo de familias rurales que viven y trabajan en el predio, con escasos recursos económicos y baja productividad, dedicadas a la ganadería extensiva destinada a la producción de carne, basada en el uso de forrajes naturales a campo abierto. La cría de cabrito se produce exclusivamente con la leche materna y su producción es normalmente la cantidad necesaria para la subsistencia de la unidad doméstica. La economía de las EAPs se completa con la posesión de unas pocas unidades de ganado bovino (destinadas al abastecimiento de leche principalmente), colmenas, pollos y gallinas y con el trabajo de los hombres de la familia en otras tareas ocasionales. Estos sistemas familiares carecen de tecnologías para el manejo de forrajes, suplementación, sanidad, provisión de agua e incluso electrificación rural.

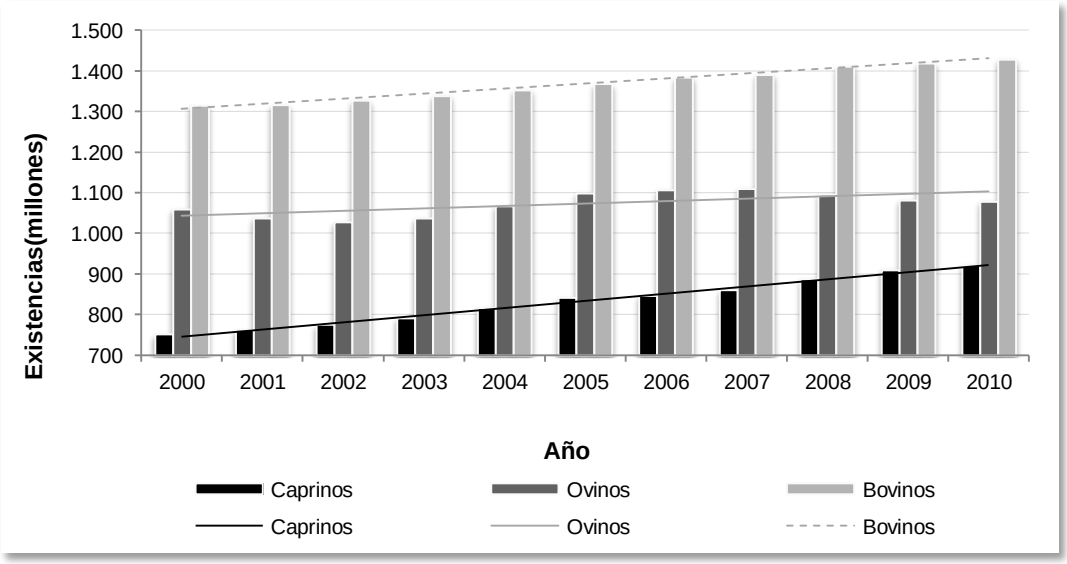



Figura 1: Evolución anual de las existencias del ganado caprino, ovino y bovino entre los años 2000 a 2010 (FAOSTAT, 2012).

Por su parte, las EAPs modernas son explotaciones caprinas intensivas, con cría de cabras y cabritos a corral, incorporación de razas más apropiadas, con aplicación de tecnologías de suplementación alimentaria, manejo sanitario y reproductivo del rodeo, lo que trae aparejado una mayor productividad y rentabilidad

En cualquier caso, el producto principal es la carne (fundamentalmente de la cría, es decir el cabrito), seguido de la leche o el cuero. La actividad lechera, en la provincia de Córdoba de Argentina está siendo fomentada desde hace algunos unos años por organismos gubernamentales y otras entidades provinciales; la propuesta representa una alternativa

de diversificación que permite incrementar los ingresos de estas pequeñas empresas familiares con una pequeña inversión inicial.

La leche de origen caprino en Argentina posee un atributo distintivo propio de un “producto especial, único o exquisito” a diferencia de otros países, donde se la considera un producto habitual. Esto es debido a la relativa escasez de la oferta y a las condiciones ambientales que influyen en su producción. Pese a que como "industria" es relativamente reciente, cuenta con fuertes potencialidades para la generación de ventajas competitivas sostenidas (Valenti, 2002).

Sin embargo existen otras limitaciones tales como la capacitación de la mano de obra, la adaptación de la explotación según normas de higiene y de sanidad, el mal estado de caminos rurales para la recolección de la leche, dificultades para la conservación de la leche y una tradición campesina más vinculada a la cría de cabra en extensivo que a la explotación intensiva. Dadas estas condiciones, el camino hacia un sistema productivo sustentable de leche caprina, en este escenario, es un gran desafío.

En este contexto, la extracción de la leche se realiza según las características de las explotaciones antes mencionadas, pero con una tendencia hacia la modernización de la unidad productiva. En el sistema tradicional el ordeño se realiza en forma manual una vez al día utilizando jarras y tambores de plástico y prácticas de colado en lienzos. El refrigerado se realiza en recipientes con agua o en congeladores domésticos y luego se transporta en camionetas utilizando hielo. La lactancia depende de los ciclos naturales de ovulación y pariciones, al igual que la disponibilidad de pasturas, aunque en este tipo de sistemas es posible en ocasiones la alimentación suplementaria de las cabras. Teniendo en cuenta una duración de la lactancia de 2 meses y un excedente diario de 250 ml por animal, una cabra produciría aproximadamente 15 litros por parición (Matta *et al*, 2007).

En el modelo moderno, el ordeño puede hacerse dos veces al día de manera mecánica (con diferentes tecnologías), con técnicas de autolimpieza y desinfección. El refrigerado y el transporte se realiza con equipos especiales que mantienen constante la temperatura de la leche. El manejo del rodeo permite controlar los partos y alargar así la lactancia, del mismo modo que existen mayores controles sanitarios y una alimentación suplementaria. Las instalaciones se adecuan a los requerimientos de organismos de certificación y permiten realizar el proceso de ordeño de manera más eficiente (corrales, salas de ordeño y equipos de frío) (Matta *et al*, 2007).

La sanidad de los hatos de las EAPs está vinculada a las características descriptas previamente. En el sistema tradicional, y debido a la falta de atención veterinaria, los animales son asistidos por sus propietarios conllevando a fracasos terapéuticos. Por otra

parte si bien existe mayor control sanitario en el sistema moderno, la intensificación de la producción a su vez incrementa el riesgo de presentación de enfermedades, fundamentalmente de origen parasitario e infeccioso.

Un estudio realizado por Rossanigo *et al* (2002) durante los años 1999 al 2001 en el noroeste argentino y en más de 8000 animales, evidenció que un 15 % de las enfermedades eran de origen infeccioso. Por su parte Bedotti y Sánchez Rodríguez (2004), recopilaron los resultados de una serie de encuestas realizadas en la provincia de La Pampa (Argentina) entre 1991 y 1995 tendientes a determinar la prevalencia de algunas enfermedades en aproximadamente 7000 animales. Entre las enfermedades infecciosas la más común fue el ectima contagioso (parapoxvirus), siendo reconocido como problema por el 81 % de los productores, y se presenta afectando un alto porcentaje de los cabritos. Le siguieron en importancia las diarreas de los cabritos (67%) producidas mayormente por *Escherichia coli* y las mastitis (60 %).

Las enfermedades infecciosas que pueden presentarse con mayor frecuencia en los caprinos, se presentan en la tabla 1. Dichas patologías son importantes de controlar por afectar a la salud y bienestar animal, a la producción de cabritos y de leche, e inclusive en algunos casos por tratarse de enfermedades zoonóticas, que afectan a la salud pública (como es el caso de tuberculosis, brucelosis y fiebre Q). Las pérdidas por los abortos, las afecciones gastroentéricas, respiratorias y las mastitis de origen infeccioso, son comunes en las EAPs caprinas (Smith y Sherman, 2009).

En las explotaciones lecheras caprinas la mastitis posee una incidencia variable de acuerdo a las condiciones nutricionales, sanitarias y de manejo de cada explotación. Es un problema para los tambos caprinos ya que afecta a la calidad y seguridad de la leche, pudiendo generar grandes pérdidas económicas al productor e incluso poniendo en riesgo la salud pública.

La mastitis subclínica suele ser la más frecuente con una incidencia que puede superar en algunos casos el 30%, siendo los estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Staphylococcus aureus* y estreptococos los principales microorganismos involucrados (Bergonier *et al*, 2003) (figura 2).

Por otra parte, las mastitis clínicas presentan en general una incidencia baja (menor al 5%), salvo en casos de brotes epidémicos en donde la prevalencia puede ascender al 50%. A menudo pueden provocar alteraciones permanentes en la glándula mamaria e incluso la pérdida de la misma, y en algunos casos la infección mamaria suele ser tan grave que los animales mueren o son sacrificados (principalmente en los 2 – 3 primeros meses de lactación). Los agentes más comunes en casos clínicos suelen ser *S. aureus,*

*estreptococos, enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Clostridium perfringens* y el virus de la artritis encefalitis caprina (Corrales *et al*, 1997; Bergonier *et al*, 2003).

Tabla 1: enfermedades infecciosas frecuentes en los caprinos, agrupadas por grupo etario de riesgo.

| CATERGORÍA DE RIESGO | PATOLOGÍA | AGENTE |
|---|---|---|
| **NEONATOS Y JÓVENES** | Diarrea | Rotavirus, Coronavirus<br>*Eimeria spp*<br>*Salmonella dublin, Salmonella typhimurium*<br>*Cryptosporidium parvum*<br>*Escherichia coli* |
| | Endotoxemia | *Escherichia coli* |
| | Septicemia | *Escherichia coli* |
| | Estomatitis (ectima contagioso; boquera; estomatitis papulosa) | Parapoxvirus |
| **ADULTOS** | Aborto | *Brucela melitensis, B. suis, B. abortus* y *B. canis*<br>*Chlamydia psittaci* (aborto enzoótico)<br>*Coxiella burnetii* (fiebre Q)<br>*Leptospira interrongans* var. *grippotyphosa* y *pomona*<br>*Listeria monocitogenes*<br>*Salmonella abortus ovis* (aborto paratífico)<br>*Toxoplasma gondii* |
| | Artritis encefalitis | Lentivirus |
| | Paratuberculosis | *Mycobacterium paratuberculosis* |
| | Linfadenitis caseosa (pseudotuberculosis) | *Corynebacterium pseudotuberculosis* |
| | Listeriosis | *Listeria monocytogenes* |
| | Mastitis | *Enterobacteriaceae*<br>*Staphylococcus* coagulasa negativo<br>*Strepetococcus spp* |
| | Agalaxia contagiosa | *Mycoplasma agalactiae* |
| **TODAS LAS EDADES** | Gangrena enfisematosa | *Clostridium chauvoei (feseri)* |
| | Hepatitis necrótica | *Clostridium novyi* tipo B |
| | Enterotoxemia | *Clostridium perfringens* (tipos C y D) |
| | Edema maligno | *Clostridium septicum* |
| | Tétanos | *Clostridium tetani* |
| | Panadizo (flemón interdigital) | *Fusiformis nodosus, Sphaerophorus necrophorus* |
| | Neumonías. Septicemias (pasteurelosis) | *Mannheimia haemolytica, Pasteurella. multocida* |
| | Tuberculosis | *Mycobacterium bovis* |
| | Pleuroneumonía contagiosa caprina | *Mycoplasma mycoide* subespecie *capri* |

Uno de los puntos más destacables en el control de las diferentes enfermedades de etiología infecciosa bacteriana, es la utilización de medicamentos antimicrobianos (ATMs). El tratamiento con estos agentes se realiza para recuperar a los animales infectados, eliminar focos infecciosos y aminorar las pérdidas productivas a futuro.

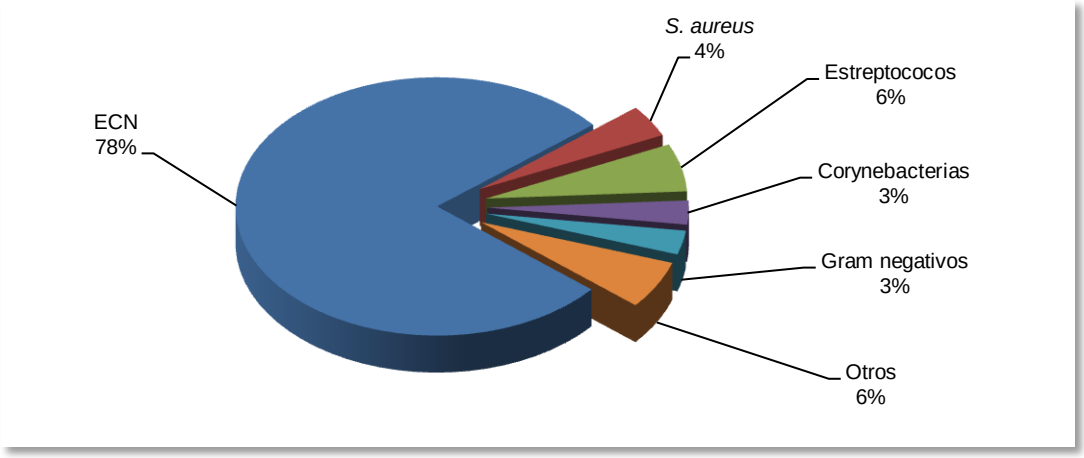



Figura 2: Incidencia de los principales patógenos productores de mastitis subclínicas en cabras. ECN: estafilococos coagulasa negativos.

### I.2.- Terapéutica antimicrobiana

Una práctica común en la clínica cotidiana es realizar extrapolaciones posológicas de una especie a otra similar, como por ejemplo de bovinos a ovinos o caprinos, dado que muchas veces no existen estudios que determinen el esquema terapéutico en cada especie en particular. Por otra parte, en numerosas ocasiones se realizan tratamientos sin tener en cuenta que el estado fisiológico (como la edad, el estado de gravidez o la lactancia) puede afectar la absorción, la distribución, el metabolismo y/o la eliminación de los ATMs, es decir la farmacocinética y consecuentemente el grado de eficacia de dicho medicamento.

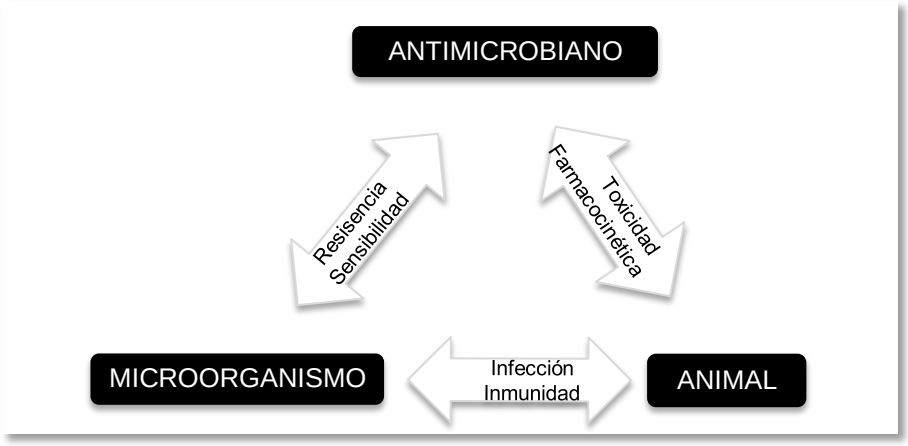
El uso no racional de los fármacos ATMs no sólo puede conllevar al fracaso terapéutico, sino que incrementa factores de riesgo tales como la presencia de residuos de estos xenobióticos en alimentos de origen animal y en el ambiente, los problemas de toxicidad en el animal al cual se los administra, o la presentación de resistencia bacteriana, una amenaza cada vez más preocupante (Boerlin y White, 2006; San Andrés y Boggio, 2007).

Existen múltiples factores que pueden incidir directa o indirectamente en el éxito terapéutico ATM, y que clásicamente se agrupan en una tríada conformada por la interacción entre el agente infeccioso, el fármaco ATM y las características del animal infectado y que es tratado (figura 3) (Davis *et al*, 1968).

Así por ejemplo, en el caso del tratamiento de la mastitis, la vía de elección (intramamaria o inyectable) dependerá en gran medida de la localización (y extensión) del foco infeccioso y las características cinéticas del fármaco a emplear. Más adelante se comentarán los diferentes factores que modifican la capacidad de un ATM en llegar en

concentraciones adecuadas a la glándula mamaria, sin embargo podemos adelantar que la vía inyectable es reservada para moléculas que atraviesan bien barreras biológicas y en casos en donde la infección compromete las partes más profundas de la glándula, ya que a través de la sangre el ATM puede llegar en forma más uniforme a todo el tejido, aunque también se requieren tiempos de espera más prolongados. Mientras que la vía intramamaria es de elección para realizar tratamientos en infecciones más localizadas o como terapia de secado. Pueden administrarse por esta vía moléculas hidrosolubles que atraviesan poco las barreras celulares. Este efecto permite concentrar el antibiótico en la glándula. Una desventaja de este tipo de administración es que gran parte del ATM se va en el ordeño.

Figura 3: relación entre el antimicrobiano, microorganismo y el animal, para el éxito terapéutico.




En lo sucesivo se hará referencia a los factores del animal relacionados con el tema de esta tesis y que influyen en la farmacocinética de ATMs, como así también se tratará la importancia del enfoque integrado farmacocinético y farmacodinámico como un indicador de la eficacia y seguridad del tratamiento ATM.

### I.2.1.- Factores del animal que afectan la farmacocinética de los antimicrobianos.

Son numerosos los factores que influyen sobre la absorción, distribución y eliminación de fármacos y tienen que ver con las particularidades propias de la molécula (tales como el peso molecular y tamaño, grado de ionización y lipofilicidad entre otros) y su vía de administración, así como las diferentes características del animal.

La especie es el primer factor a considerar, pues, cada una presenta particularidades anatomo-fisiológicas que afectan la biodisponibilidad de los fármacos. Cuanto más

alejadas se encuentren las especies, desde un punto de vista filogenético, mayores diferencias farmacocinéticas se observaran entre las mismas. Es así que hay pronunciadas disimilitudes entre aves y mamíferos, entre carnívoros y herbívoros, y entre no rumiantes y rumiantes. Por este motivo, y como se mencionó anteriormente, históricamente se han extrapolado regímenes terapéuticos de forma meramente empíricas de una especie a otra, cuando no se disponía de los conocimientos necesarios en una de ellas pero si en la otra. Para el caso de ATMs, y considerando su baja toxicidad general, esta metodología se ha empleado sistemáticamente. En caprinos, por ejemplo, por considerarse una especie similar al ovino, se han extrapolado datos desde la especie ovina, puesto a que existen mayores estudios en esta última (Baggot, 2006) e incluso desde bovinos si se consideraba necesario.

Otros predisponentes que influyen sobre los aspectos farmacocinéticos incluyen los estados patológicos (principalmente a nivel hepático o renal por alterar los sistemas de eliminación) y fisiológicos. Debido a la temática de este trabajo, nos centraremos específicamente en estos últimos, haciendo hincapié en la edad, la gestación y la lactancia.

Edad

El nacimiento determina el cese de la protección intrauterina y del aporte placentario de oxígeno, agua y nutrientes. El feto pasa de un medio ambiente isotérmico, oscuro, acuoso y estéril a otro de temperatura cambiante, luminoso, aéreo y contaminado. Este cambio brusco requiere un gran esfuerzo de adaptación fisiológica por el organismo en conjunto y por sus distintos órganos, aparatos y sistemas particulares (Balboa de Paz y Rueda, 2004). La maduración de los órganos ocurre de forma paulatina desde el nacimiento; esto implica que los procesos farmacocinéticos también experimentan maduración, y hasta que se normalizan o alcanzan los valores del adulto transcurre un período de tiempo que varía para cada proceso en particular. No obstante, en la vejez, la funcionalidad de estos sistemas orgánicos sufren una apreciable disminución (Baggot, 2001).

Como consecuencia, los regímenes de dosificación, que normalmente son desarrollados a partir de estudios en los que se utilizan animales adultos, no pueden ser simplemente extrapolados a neonatos o a pacientes seniles de la misma especie ya que muchas de las modificaciones fisiológicas que acontecen a lo largo de la vida, pueden alterar las concentraciones y el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo. Por lo expuesto, desde el punto de vista farmacocinético podríamos considerar tres grupos

etarios bien diferenciados, esto es, el de los individuos jóvenes, el de los adultos y el de los seniles.

Son diversos los factores que afectan la distribución de fármacos que tienen la particularidad de diferir entre neonatos y adultos y que por lo tanto originan modificaciones en la disposición cinética en estos animales.

El agua corporal, que constituye del 60 al 75% del organismo, puede considerarse distribuida en varios compartimentos. Algo más de la mitad está contenida en el interior de las células, por lo que el agua intracelular constituye del 30 al 40% del peso corporal. El líquido extracelular incluye el plasma sanguíneo (4-5%), el líquido intersticial (16- 18%) y el transcelular (1-3%) (Baggot, 2001).

El contenido acuoso es más bajo en los adultos que en los recién nacidos. Así, el agua corporal puede comprender el 75% del peso total en un animal neonato, mientras que en un adulto es del 60%. En el caso de las cabras, el volumen extracelular representa el 43% del peso corporal a la primera semana de vida, mientras que a la tercera desciende al 34%. Ese descenso en el volumen acuoso es más notorio en los primeros meses, pero continúa lentamente hasta la edad adulta (Gürtler *et al*, 1987).

Es importante destacar que después del nacimiento se producen modificaciones entre las proporciones de cada uno de estos compartimentos. Así, mientras el volumen de líquido extracelular se reduce, el del líquido intracelular aumenta (Friis, 1979; Balboa de Paz y Rueda, 2004). El desarrollo de este tipo de cambios podría tener un efecto significativo en la distribución de fármacos polares, compuestos hidrosolubles como el caso de penicilinas, aminoglucósidos y antiinflamatorios no esteroideos (Baggot, 2001, Balboa de Paz y Rueda, 2004).

Aunque los fluidos del contenido gastrointestinal pueden considerarse extracorpóreos, conviene tener presente que en el caso concreto de los rumiantes el contenido del tubo digestivo, que representa del 12 al 15% del peso corporal, puede constituir un compartimento especial de “distribución” para ciertos compuestos, como sucede con el rumen-retículo, pudiendo realizarse un intercambio bidireccional de fármacos y justificando así los elevados volúmenes de distribución descritos para algunos fármacos en estas especies (Dunlop, 1983).

En los rumiantes el desarrollo de los preestómagos es incompleto al momento del nacimiento, pudiéndose dividir en general en tres etapas: del nacimiento a las tres semanas de edad, donde el rumen y el retículo no son funcionales; de tres a ocho

semanas, aquí los preestómagos inician su desarrollo y de las ocho semanas en adelante, cuando estos órganos son por completo funcionales (Gürtler *et al*, 1987).

En los terneros recién nacidos pueden distinguirse claramente las cuatro cavidades que conforman los preestómagos y el abomaso, donde éste último ocupa entre el 56 al 62% del volumen total del complejo gástrico. Como resultado de la ingestión de alimentos vegetales, se produce después un notable desarrollo de los preestómagos, de manera que a la edad de cuatro semanas constituyen, el rumen y el retículo, el 64% del volumen gástrico total, cifra que se eleva al 75% a las doce semanas. En los animales adultos esta proporción acaba por ser del 87% del volumen total (Gürtler *et al*, 1987).

La unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas es otro factor importante a tener en cuenta, ya que solamente la fracción no unida puede atravesar membranas biológicas. Esta unión depende de la cantidad y tipo de proteína presentes y de la afinidad del fármaco hacia las mismas. Debido a que los neonatos presentan una menor cantidad de proteínas plasmáticas que los adultos, el grado de unión está condicionado por la edad del animal (Baggot, 2001).

En el cerdo, la unión del trimetropin a las proteínas plasmáticas se incrementa de un 45% en el neonato al 75% en el adulto (Gyrd-Hansen *et al*, 1984). También en cerdos, la unión del ácido salicílico a las proteínas plasmáticas se incrementa en forma paralela al aumento en la concentración de albúminas en plasma (Short y Tumbleson, 1973).

Por lo tanto, se puede concluir que en los neonatos existe una menor tasa de unión a las proteínas plasmáticas y por ende los fármacos pueden evidenciar una mayor distribución (Baggot, 2001).

En general, el tejido adiposo y la masa muscular son sustancialmente más escasos en animales jóvenes que en animales maduros. Como consecuencia de la mayor afinidad de los fármacos liposolubles por el tejido adiposo, se podría predecir que la carencia de estos depósitos en los neonatos limitaría la captación de dichos fármacos y por tanto se generaría una disminución de su efecto (Baggot, 2001).

Una diferencia adicional, particularmente en el período neonatal temprano, es la carencia en el desarrollo de ciertas barreras como es el caso de la hematoencefálica que en condiciones normales dificulta el acceso de los fármacos a través de ella al SNC; esta ausencia de desarrollo completo permite la difusión hacia estas zonas en el neonato, de manera que se alcanzan concentraciones terapéuticas en LCR de fármacos para los que en condiciones normales no sería accesible en adultos. Tal es el caso de la penicilina, que solamente atraviesa la barrera hematoencefálica en neonatos o cuando se ha alterado la

integridad de la misma por algún proceso patológico, como una inflamación (meningitis) (Shoaf *et al*, 1989; Nau *et al*, 2010).

En lo referente a la biotransformación, el grado de desarrollo de las vías metabólicas al nacimiento es diferente para cada una de ellas; así la actividad oxidativa del sistema microsomal citocromo P-450 al igual que las reacciones de glucuronoconjugación están poco desarrolladas en neonatos, en tanto que la capacidad de acilación y conjugación con sulfatos y glicina en el recién nacido es similar a la de los adultos (Nouws, 1992).

El metabolismo oxidativo en terneros se desarrolla de manera gradual, siendo similar al de los adultos entre las 3 y 12 semanas de vida (Nouws, 1992). Es importante consignar que la naturaleza del fármaco al igual que la composición del alimento afectan el desarrollo del metabolismo oxidativo a nivel hepático, así la ingesta de alimentos toscos estimula los procesos de oxidación, mientras que la alimentación con leche parece demorarla (Kawalek y el Said, 1994). En terneros, se ha demostrado que existe una baja capacidad oxidativa durante los primeros días de vida para varias sulfamidas (Nouws, 1992).

Muchas reacciones de oxidación son seguidas por conjugación con ácido glucurónico. Esta vía metabólica acelera notoriamente la excreción renal de los fármacos que sufren este proceso. La glucuronoconjugación es una importante vía metabólica para fármacos del tipo alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos y amidas, y requiere aproximadamente entre 2 a 8 semanas en potrillos, terneros y niños para desarrollarse completamente (Adamson *et al*, 1991; Baggot, 2001).

Como consecuencia de estas deficiencias enzimáticas los compuestos no polares, que requieren de biotransformación para originar metabolitos rápidamente excretables, permanecerían por más tiempo en el cuerpo de los animales inmaduros que en los adultos (Schwark, 1992).

La principal ruta de excreción de fármacos y sus metabolitos es por riñon. El fármaco libre en plasma, es decir aquel no unido a proteínas, alcanza la luz tubular por filtración glomerular, y en el caso de bases y ácidos débiles por secreción tubular. La cantidad final de fármaco eliminado en la orina está gobernado por el grado de reabsorción tubular que acontece en la nefrona distal. Esto se ve afectado por factores tales como la concentración de orina, el pH urinario y pK del fármaco. Debido a que los cambios en la dieta provocan modificaciones en el pH urinario, éste es un factor que puede afectar el grado de ionización del fármaco y por ende la reabsorción tubular (Watson *et al*, 1987; Baggot 2001).

La funcionalidad renal es incompleta en la mayoría de los animales al momento del nacimiento. En las especies rumiantes, parece ser completa entre la primera y segunda semana de vida (Baggot, 2001).

El desarrollo de la filtración glomerular requiere solamente de 2 a 7 días en rumiantes neonatos, pero necesita más de 2 semanas en cerdos, perros y humanos (De Backer, 1986; Friis, 1979; Nouws ,1992). Para aquellos fármacos que son eliminados principalmente por filtración glomerular y que no son metabolizadas, se debe esperar tasas de aclaramiento similares entre rumiantes neonatos de más de dos semanas y adultos (Burrows *et al*, 1983; De Backer, 1986).

La maduración de la función tubular requiere más tiempo y, por lo tanto, los efectos que ejerce sobre la farmacocinética son más pronunciados que la filtración glomerular. En rumiantes la madurez se alcanza dentro de las 2 a 3 semanas, mientras que en cerdos y perros se requieren 4 a 8 semanas (De Backer, 1986; Friis, 1979; 1983; Nouws, 1992).

Gestación

La gestación es un estado fisiológico al cual se le da mucha importancia en estudios cinéticos ya que, se busca determinar la llegada al feto de distintos medicamentos y los posibles efectos adversos que en él puedan tener; bien por, afectar el desarrollo e implantación del blastocisto, la aparición de efectos teratógenos de tipo morfológico, afectar la organogénesis de manera negativa, o aparecer alteraciones funcionales, según el período en que se administre el fármaco (Vallano y Arnau, 2009).

A su vez la farmacocinética se ve afectada en la madre, durante este estado fisiológico. Tanto el vaciado gástrico como la motilidad intestinal se encuentran reducidos a causa de las altas concentraciones de progesterona, pudiendo reducir y prolongar la absorción de fármacos que se administren por vía oral. A su vez, se genera un aumento en el pH gástrico debido a una reducción en la secreción de hidrogeniones y un aumento en la producción de mucus, pudiendo verse afectada de esta manera la absorción de fármacos ácidos (Dawes y Chowienczyk, 2001).

El aumento del volumen minuto cardiaco y de la perfusión tisular observados durante la preñez, podrían llevar a un aumento en la absorción de fármacos que se administren por vía inhalatoria o intramuscular, respectivamente (Dawes y Chowienczyk, 2001).

Sin embargo, a pesar de estos cambios no todos los fármacos ven modificado su absorción durante la gestación, como es el caso del pivmecilinam administrado por vía oral a mujeres gestantes y no gestantes (Heikkilä *et al*, 1992a).

El aumento del volumen intravascular así como del agua y de la grasa corporal que ocurre durante la preñez puede crear un mayor espacio en el que se distribuyan tanto los fármacos hidrosolubles como liposolubles, pudiendo conducir a un aumento en el volumen de distribución y a una disminución en las concentraciones plasmáticas de los mismos. Por otra parte la albúmina y otras proteínas del plasma se encuentran disminuidas durante la preñez, aspecto a tener en cuenta debido a que puede conducir a un aumento en el porcentaje de fármaco libre, con el consiguiente aumento en el efecto terapéutico o tóxico (Dawes y Chowienczyk, 2001).

Un aumento en el volumen de distribución durante la gestación ha sido reportado en humanos para el mecilinam (Heikkilä *et al*, 1992a) y el imipenem (Heikkilä *et al*, 1992b). Estudios realizados con distintos anestésicos locales en ovejas han demostrado que durante la gestación se produce un aumento en el volumen de distribución de la lidocaína (Santos *et al*, 1988), mientras que el de la ropivacaína y el de la bupivacaína se vio disminuido (Santos *et al*, 1997).

Durante la gestación se produce un aumento en la síntesis de algunas enzimas hepáticas del complejo citocromo P-450 y en el flujo sanguíneo renal de hasta un 80%; esto podría aumentar la cantidad y velocidad de eliminación de los fármacos que utilicen cualquiera de estas vías (Dawes y Chowienczyk, 2001). Sin embargo, no es posible hacer una generalización al respecto, pues para fármacos como la ivermectina, se vio un aumento en el tiempo medio de residencia en ovejas preñadas (Pérez *et al*, 2008b) mientras que en estudios realizados con anestésicos locales el aclaramiento de la ropivacaína y el de la bupivacaína se vio disminuido (Santos *et al*, 1997).

Se debe tener en cuenta que, durante la preñez, los fármacos pueden atravesar la barrera placentaria y llegar en distintas concentraciones a la sangre fetal. De ello dependen, fundamentalmente, las características fisicoquímicas del fármaco, su unión a proteínas plasmáticas y la morfología y funcionalidad de las membranas placentarias.

La placenta es una barrera celular muy compleja, derivada de los tejidos fetales y maternos y que no se desarrolla inmediatamente después de la fecundación, sino que aparece entre los 4,5 a 9 días, según la especie, después de la implantación. Un número importante de fármacos administrados a la madre atraviesan la placenta y entran en la circulación del embrión/feto, siendo por este motivo cuestionable la aplicación del término “barrera placentaria” tomado en el sentido de “protección” del individuo que se está

gestando. Según progresa la gestación, las características morfológicas de la placenta van cambiando, e inclusive, las capas de tejido interpuestas entre los capilares fetales y la sangre materna van disminuyendo de grosor, de forma que la superficie de intercambio entre la circulación materna y fetal va aumentando (San Andrés y De Lucas, 2007).

Los fármacos se transportan a través de la placenta fundamentalmente por difusión simple, pudiéndose calcular la cantidad de sustancias que pasan la misma por medio de la ecuación establecida por la ley de Fick, la cual indica que el flujo de moléculas es proporcional a la diferencia de concentración en ambos lados de una membrana, dependiendo de su superficie y su espesor. Habrá, por lo tanto, una mayor o menor dificultad de paso de los fármacos a través de la placenta, dependiendo del número y la superficie de las membranas que la constituyan y que separen la sangre materna de la fetal.

Si se tiene en cuenta la superficie de paso, es preciso tener en cuenta la clasificación macroscópica de los tipos de placenta, la cual tiene en cuenta la distribución de las vellosidades coriales sobre la superficie del endometrio (figura 4). En algunas especies (cerda o yegua), estas vellosidades se dispersan por casi toda la superficie del corion, denominándose a este tipo de placentas como difusas. En otras especies (rumiantes), se desarrollan placas dispersas o cotiledones frente a las carúnculas endometriales; cada cotiledón y su respectiva carúncula constituyen una unidad aparte o placentoma que colectivamente conforman una placenta cotiledónea. En un tercer grupo (perras, gatas) las vellosidades se desarrollan en una banda de corion que rodea al embrión, formando una placenta zonal. El cuarto y último tipo, común de primates y roedores, las vellosidades se concentran en una gran placa que forma una placenta discoidal (Dyce, 2007)

Por otro lado, y teniendo en cuenta el número de membranas que ha de atravesar el fármaco, y que el tipo de placentación es distinto dependiendo de la especie animal, la mayoría de los fármacos pasarán la barrera placentaria con distinto grado de dificultad en función de la especie.

Seis capas de tejido separan el torrente sanguíneo materno del fetal (figura 4): endotelio capilar coriónico, tejido conectivo, epitelio fetal, epitelio endometrial, tejido conectivo y endotelio capilar materno. Las seis capas persisten en la placenta epiteliocorial de la yegua y cerda; se han reducido a cuatro (por pérdida del epitelio coriónico y tejido conectivo) en la placenta endoteliocorial de las perras y gatas, y cuando el corion fetal se pone en contacto directo con la sangre materna, como es el caso de los primates y roedores es de tipo hemocorial. Hay que hacer constar que en algunas zonas de la

placenta de los roedores se pone en contacto el endotelio fetal con la sangre materna, denominándose hemoendotelial (Dyce, 2007).

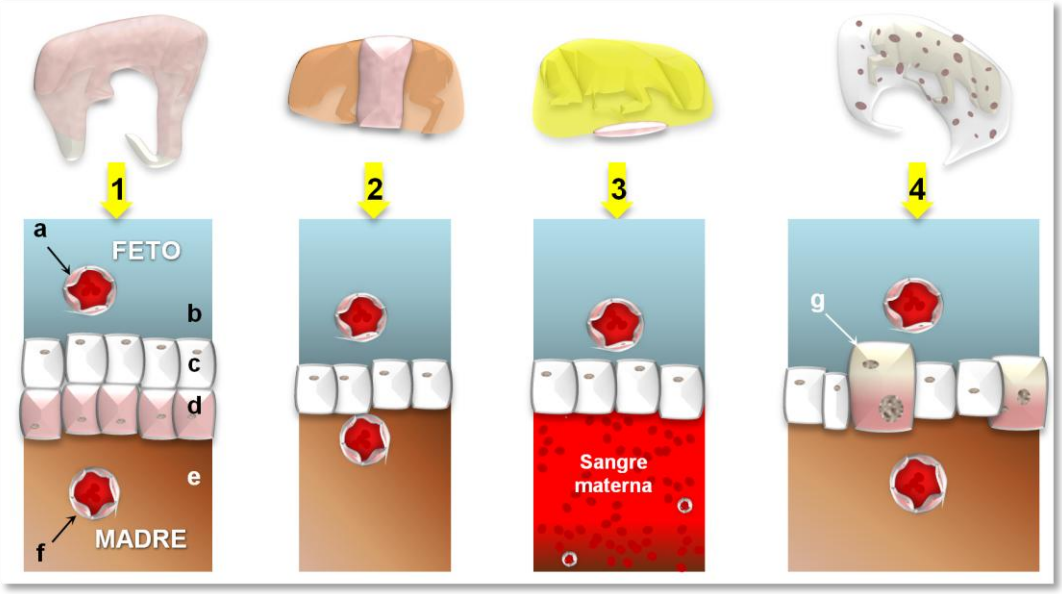



Figura 4: Representación esquemática de los tipos de placenta según la clasificación anatómica e histológica, respectivamente: 1) difusa, epiteliocorial; 2) zonal, endoteliocorial; 3) discoidal, hemocorial; 4) cotiledónea, sinepiteliocorial. a) Endotelio fetal; b) tejido conjuntivo fetal; c) epitelio coriónico; d) epitelio endometrial; e) tejido conjuntivo uterino; f) endotelio uterino; g) células trofoblásticas gigantes.

En lo referente a la placenta de los rumiantes, durante muchas décadas se la ha considerado como del tipo sindesmocorial, debido a la pérdida del epitelio materno; sin embargo actualmente se sabe que poseen un tipo especial de placenta epiteliocorial, que se denomina sinepiteliocorial, debido a que parte del epitelio uterino se fusiona con algunas células trofoblásticas y forman sincitios que tienen un doble origen: materno y fetal (Igwebuike, 2006; Barbeito, 2008; Hafez *et al*, 2010). En el trofoblasto de la placenta de los rumiantes aparecen células gigantes que frecuentemente son binucleadas y que constituyen cerca del 20 % de la placenta fetal (figura 4: 4.f). Durante el desarrollo, migran desde el epitelio coriónico y alcanzan el epitelio endometrial con el que pueden fusionarse. Las células gigantes no poseen, como el resto del trofoblasto, función absortiva sino que secretan hormonas proteicas y esteroides. Como resultado de la fusión, estas células presentan una superficie no polarizada expuesta a los vasos maternos y fetales, de esa manera pueden liberar sus secreciones en ambos sentidos (Barbeito, 2008).

La placenta en su rol de protector fetal posee distintos sistemas encargados de limitar el pasaje de sustancias para disminuir su presencia en el feto, que no se restringen solamente a la estructura morfológica. En los años recientes se han profundizado los

estudios en farmacología molecular y farmacogenética fundamentalmente sobre las placentas de roedores y mujeres, debido a la presencia de proteínas que actúan como bombas de eflujo de aquellos xenobióticos que pudieran pasar hacia el feto (Marin *et al*, 2004). Estas proteínas que dependen de ATP, son denominadas conjuntamente como ABC (del inglés *ATP-bindig cassette*), y son una superfamilia de transportadores que incluyen tres grupos moleculares presentes en la placenta, las glucoproteínas P (*P-glycoprotein* P-gp, MDR1 codificadas por el gen *ABCB1*), las proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas (*multidrug resistance-associated proteins* MRPs codificadas por los genes *ABCC1-6 y ABCC10-12*) y las proteínas de resistencia al cáncer de mama (*breast cancer resistance protein* BCRP, codificada por el gen *ABCG2*) (Pavek *et al*, 2009). Las P-gp son las primeras que se descubrieron y, hasta ahora, son las mejor caracterizadas en el trofoblasto placentario (Ceckova-Novotn *et al*, 2006). Son capaces de bombear una variedad extremadamente amplia de compuestos químicos estructuralmente diferentes, incluyendo fármacos citotóxicos, ATMs, opiáceos, antieméticos y muchos otros xenobióticos (Schinkel y Jonker, 2003, Fromm, 2004) a través de la placenta, en dirección feto-madre, ofreciendo con ello la protección al feto en desarrollo.

Además de este grupo de proteínas de membrana, la placenta cumple funciones metabólicas que colaboran con la ausencia de xenobióticos en el feto. Sin embargo, y como ya se mencionó, siguen existiendo probabilidades que los fármacos pasen hacia el mismo, ya sea por el carácter lipofílico o no polar del mismo, por el tipo de placenta que se trate, o bien, por la saturación tanto de las proteínas de eflujo (tipo P-gp) como de las enzimas que participan en el metabolismo.

Cuando el fármaco logra pasar a la circulación fetal, desde la vena umbilical se distribuye directamente hacia la circulación general, eludiendo al hígado por la presencia del *ductus venoso* y la principal vía de eliminación desde el feto, es el retorno hacia la circulación materna vía arteria umbilical. Es de destacar, que el pH más ácido de la sangre fetal hace que moléculas básicas sufran atrapamiento iónico (Dawes y Chowienczyk, 2001), generando que los fármacos con esta característica queden retenidos por mayor tiempo en el feto que las moléculas ácidas.

En la bibliografía existen diferentes investigaciones que evalúan el paso de fármacos hacia el feto y que fundamentan la presencia o ausencia de los mismos en el feto según lo explicado anteriormente. Así Heikkilä *et al* (1992a y 1992b) administraron mecilinam e imipenem, respectivamente, a mujeres embarazas y demostraron que ambos ATMs atraviesan rápidamente la barrera placentaria alcanzando altas concentraciones en sangre umbilical, a su vez, el pasaje al líquido amniótico y la eliminación del fármaco por parte del

feto parece ser mínima. La administración de distintos ATMs del grupo de los macrólidos en primates no humanos (Schoondermark Van de Ven *et al*, 1994), o en humanos (Heikkinen *et al*, 2000; Ramsey *et al*, 2003; Witt *et al*, 2003) demostraron que las concentraciones encontradas en sangre fetal oscilaron entre un 5 y un 7 % de las encontradas en sangre materna. Al contrario de estos xenobióticos, se evidenció que la gentamicina no atraviesa la barrera placentaria de las yeguas, debido a la ausencia del mismo en sangre fetal (Santschi y Papich, 2000).

Lactancia

Si bien existe abundante información acerca de lo que sucede específicamente con el paso de fármacos desde sangre hacia la leche, tanto para tratar una infección mamaria, como para investigar la presencia de residuos de xenobióticos por encima de los niveles de tolerancia permitidos, son escasos los trabajos en los que se compara la farmacocinética en los individuos en lactación con otros estados fisiológicos.

Durante este período es intuitivo pensar que lo que está afectado es la eliminación de fármacos, ya que la leche constituye una importante vía de excreción para muchos de ellos. Sin embargo, debido a que durante la lactancia ocurren cambios hormonales que inciden en el porcentaje de grasa corporal, el peso y la masa muscular (Martinez y Modric, 2010), no sólo la eliminación se podría ver afectada, sino también la absorción y la distribución de fármacos.

Estudios realizados en mujeres demostraron que durante la lactancia se produce un aumento en las concentraciones plasmáticas de α-glucoproteínas, (Fleishaker *et al*, 1989), por lo que aquellos fármacos que se unan a éstas podrían sufrir modificaciones en el porcentaje de fármaco libre así como también en el volumen de distribución.

En este estado fisiológico, también se incrementan los ácidos grasos libres por los cuales los fármacos de carácter ácido son afines, y consecuentemente, la unión de este tipo de fármacos por las proteínas plasmáticas disminuye (Aramayona *et al*, 1996). A su vez, el aumento de los ácidos grasos libres produce alteraciones en el metabolismo de algunos xenobióticos (Igarza *et al*, 2002), pudiendo repercutir en el aclaramiento de los mismos.

La cantidad de fármaco secretado a la leche aumenta en la medida que lo hace su liposolubilidad y disminuye su peso molecular, su afinidad por proteínas plasmáticas y su grado de ionización. En lo referente a este último aspecto, la proporción de fármaco ionizado / no ionizado es una función de la interacción entre el $pK_a$ que posea y el pH del medio donde se encuentre Como el pH normal de la leche (≈6,5 - 6,7) es menor que el pH

del plasma (≈7,4), las moléculas bases débiles, que en sangre se encuentran mayormente como no ionizadas, difundirán con mayor facilidad hacia la leche que las moléculas ácidas, y una vez, en ese medio, el equilibrio virará hacia la fracción ionizada (Banerjee *et al*, 1967; Ito y Lee, 2003; Martinez y Modric, 2010, Rule *et al*, 2011). En la tabla 2 se muestran las diferentes relaciones entre la cantidad de ATMs en leche y la encontrada en plasma en función del $pK_a$ y la liposolubilidad de cada molécula (San Andrés y De Lucas, 2007).

Tabla 2: Relación de las concentraciones en leche y en plasma de los antimicrobianos en función de su pKa y liposolubilidad.

| **Fármaco** | **$pK_a$** | **Liposolubilidad** | **Relación de concentraciones en leche y plasma (leche / plasma)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Teórica (*)** | **Experimental** |
| Sulfacetamida | 5,4 | Baja | 0,13 | 0,08 |
| Penicilina G | 2,8 | Moderada | 0,16 | 0,20 |
| Penicilina V | 2,8 | Moderada | 0,16 | 0,22 |
| Cloxacilina | 2,8 | Alta | 0,16 | 0,22 |
| Cefaloglicina | 4,9 | Alta | 0,30 | 0,33 |
| Novobiocina | 4,3 | Alta | 0,30 | 0,33 |
| Penetamato | 8,5 | Alta | 5,7 | 5,1 |
| Neomicina | 8,3 | Baja | 7,5 | 2,3 |
| Eritromicina | 8,8 | Alta | 6,2 | 3,5 |

(*) Calculado por las ecuaciones propuestas por Jacobs (1940) para moléculas ácidas y básicas.

En aquellos casos en los que la glándula mamaria actúa como una trampa de iones, se puede convertir en un compartimiento periférico llevando a una disminución en el aclaramiento total, como ha sido informado para la ceftazidima en vacas (Rule *et al*, 1996). Sin embargo, este comportamiento no es igual para todos los fármacos, pues se ha visto que el aclaramiento plasmático de la marbofloxacina en cerdas (Petracca *et al*, 1993) y la bencilpenicilina en ovejas (Oukessou *et al*, 1990) se incrementó en el estado lactante.

Se han registrado variaciones en distribución y acumulación de ATMs en la leche conforme el período de lactancia en que se ha realizado el estudio. Así, Bengtsson *et al* (1997) demostraron que las concentraciones en suero de los ATMs β-lactámicos tanto en ovejas como en cabras fueron más bajas durante la lactación temprana que durante la tardía. Similares resultados reportaron Soback *et al* (1994) tras la administración de norfloxacina a ovejas el primer día post-parto y al momento del destete. Estas diferencias probablemente se deban a que conforme la lactancia avanza, la composición de la leche, sin considerar el calostro, varía (fundamentalmente en los porcentajes de grasa y proteínas) alterando el comportamiento cinético de los ATMs.

A su vez, existe una correlación negativa entre el tiempo de eliminación del ATM y la producción láctea del animal. Los animales de baja producción tardan más en excretar el

fármaco; Lucas *et al* (2010) demostraron este efecto con azitromicina administrada vía IM en vacas en lactancias. Por otra parte, el ordeño frecuente aumenta el efecto de dilución, por lo que el tiempo de eliminación es menor (San Andrés y De Lucas, 2007).

Por último, una fuente de variación para la penetración de los fármacos en la leche es la presencia de sistemas de transporte, si bien un alto porcentaje llega mediante difusión pasiva. Los trabajos de Edwards *et al* (2005), Al-Bataineh *et al* (2010), Antonić *et al* (2011) y Mealey (2012) demuestran la presencia de bombas de expulsión (P-gp y otras) en las membranas que conforman la barrera sangre / leche, similares a los que se describieron en el apartado de gestación.

### I.2.2.- La integración farmacocinética y farmacodinámica

Como se expuso en el apartado I.2 y según se observa en la figura 3 la farmacología de la terapéutica ATM no sólo descansa en los aspectos farmacocinéticos sino también en el estado inmunológico del animal, y en la capacidad del ATM para matar o inhibir el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. Este último aspecto está vinculado al parámetro farmacodinámico que mide la mínima concentración de ATM que inhibe el crecimiento visible de bacterias cuando un inóculo de éstas, normalmente $10^5$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), es expuesta a concentraciones fijas de diluciones 1:2 de ATM a 36 - 37ºC durante 18 a 20 horas. Dicho parámetro, denominado concentración inhibitoria mínima (CIM), proporciona información de la eficacia acumulativa de una concentración constante de ATM que actúa sobre un inóculo cuya densidad bacteriana está preestablecida (McKellar *et al*, 2004).

En los albores de la era antibiótica, se llegó a proponer que tanto las penicilinas como las sulfonamidas debían mantener concentraciones séricas y tisulares por encima de la CIM durante todo el tiempo que durase el tratamiento, a fin de eliminar las bacterias tal y como ocurría *in vitro*, asumiendo que concentraciones menores a la CIM no podían ser consideradas eficaces, dando a este parámetro un significado de todo o nada (Odenholt, 2001).

Sin embargo, la situación que se presenta en el escenario *in vivo* es completamente diferente, ya que en primer lugar, las concentraciones de ATM en plasma y tejidos fluctúan en función del tiempo, logrando un pico de concentraciones durante la fase de absorción y disminuyendo paulatinamente hasta su total eliminación. En segundo lugar, en el hospedador la carga bacteriana no es constante y ésta también varía en función de las concentraciones del ATM en el sitio en donde las bacterias se hallan. De manera que a

diferencia de lo que ocurre en los ensayos *in vitro*, en el escenario *in vivo* la relación ATM-bacteria es dinámica (Odenholt, 2001).

El éxito terapéutico entonces, depende no sólo de las concentraciones antibacterianas, sino que se introduce el concepto de tiempo de exposición, es decir, el tiempo durante el cual las bacterias están expuestas tanto a concentraciones suprainhibitorias (supra-CIM) como subinhibitorias (sub-CIM) y al intervalo entre exposiciones (intervalo entre dosis) (Odenholt, 2001).

Los diferentes ATMs resultan eficaces *in vivo* de acuerdo a lo explicado anteriormente, y algunos responden mejor cuanto mayor sea su concentración en el lugar donde asienta el foco de bacterias sensibles. Es por ello que este tipo de agentes son clasificados como fármacos ATMs con actividad concentración dependiente, estando conformado por aminoglucósidos, fluoroquinolonas y metronidazol (Craig, 1998). Estos ATMs logran una rápida reducción de la carga bacteriana, y los esquemas terapéuticos con los mismos se optimizan garantizando una dosis que logre un elevado pico de concentraciones plasmáticas (McKellar *et al* 2004).

Otros ATMs en cambio, tienen poca relación con el incremento de sus concentraciones para el efecto antibacteriano, en vez de ello su máxima eficacia se alcanza a concentraciones bajas (normalmente 2 a 4 veces por sobre la CIM), y que paradójicamente un incremento en las mismas no solo no aumenta la velocidad bactericida sino que la disminuye. De todas formas, en comparación con los fármacos concentración dependiente, la velocidad bactericida (o incluso bacteriostática) es lenta, necesitando mayor tiempo de exposición para poder reducir el tamaño del inóculo bacteriano. Estos ATMs que se comportan de esta manera se denominan tiempo dependientes, y dentro de este grupo se encuentran a las penicilinas, cefalosporinas, fenicoles, macrólidos, lincosaminas y tetraciclinas (Craig, 1998).

De acuerdo al comportamiento farmacodinámico (FD; representado por la CIM) de cada grupo de ATM, y los perfiles de concentraciones séricas en el tiempo definidas por la farmacocinética (FC) surgen los índices o parámetros integrados FC/FD (figura 5). Los mismos son: la relación entre el pico máximo de concentración plasmática y la CIM ($C_{max}$/CIM), la relación entre el área bajo la curva de concentración plasmática obtenida en 24 horas y la CIM (ABC/CIM) y el tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas son superiores a la CIM (T > CIM). Otro índice semejante al ABC/CIM, es la relación entre el ABC parcial por el período de tiempo en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la CIM frente a esaCIM (ABIC = (ABC > CIM) / CIM) (Toutain *et al*, 2002; McKellar *et al*, 2004).

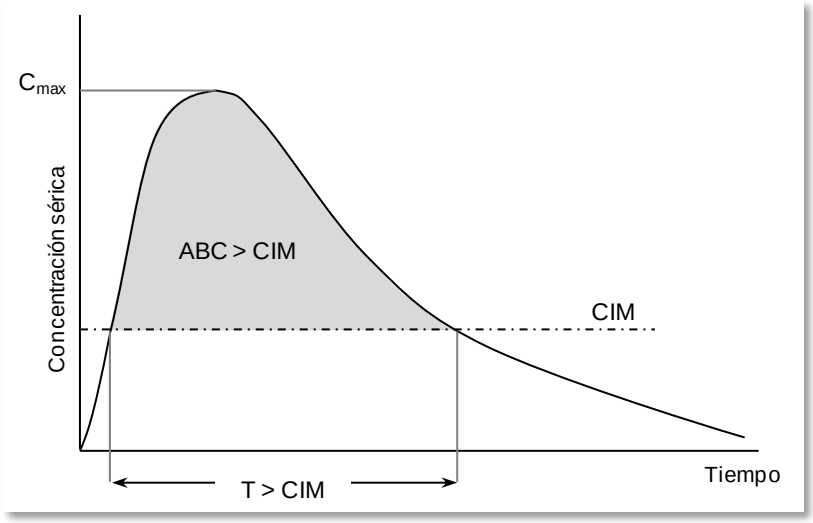



Figura 5: Parámetros que se tienen en cuenta para la integración farmacocinética y farmacodinámica (FC / FD) empleados para optimizar la actividad antimicrobiano.

Según el tipo de actividad del ATM (concentración o tiempo dependiente) será el índice que se utilice para diseñar un esquema posológico adecuado y garantizar el éxito terapéutico (tabla 3). El índice $C_{max}$/CIM se emplea para predecir la eficacia de ATMs bactericidas con actividad concentración dependiente tales como los aminoglucósidos, para los cuales se necesita lograr picos de concentración plasmática de modo que la relación $C_{max}$/CIM sea al menos de 8 a 10 unidades (Toutain *et al*, 2002; McKellar *et al*, 2004).

En el caso de las fluoroquinolonas, si bien su actividad es concentración dependiente, su prolongada semivida de eliminación hace que el mejor índice FC / FD sea el ABC/CIM o el ABIC, el cual tiene que ser ≥ 125 horas. El estado de salud influye en el valor de este parámetro, pues estudios realizados en ratones (Craig, 1998) o personas (Forrest *et al*, 1993), en ambos casos con serios compromisos del sistema inmune o sumamente graves, se determinó que se obtenía un alto porcentaje de cura bacteriológica si la relación ABC/CIM era mayor a 100 (o 125). Sin embargo Toutain *et al* (2002) y McKellar *et al* (2004) establecen que dicho valor puede ser menor en individuos inmunocompetentes. A su vez, diversos estudios han demostrado que el valor del ABC/CIM también varía según se trate de infecciones por gramnegativos o por grampositivos, mientras que el valor de 100 es necesario para el primero de los casos, un valor mucho menor de 30 a 50 se informó para los segundos (Wright *et al*, 2000; Ibrahim *et al*, 2002).

Los fenicoles, macrólidos, lincosaminas y tetraciclinas presentan una actividad tiempo dependiente y como poseen semividas de eliminación prolongadas, al igual que las

fluoroquinonas, los índices más adecuados para diseñar los esquemas posológicos son el ABC/CIM o el ABIC. Las tetraciclinas representan el único caso de ATMs cuya eficacia se garantiza según el viejo esquema terapéutico de concentraciones supra- CIM sostenidas en el tiempo y se explica, porque su mecanismo de acción es únicamente bacteriostático (Van Bambeke *et al*, 1999).

Tabla 3: Clasificación de los antimicrobianos según su modo de acción, los parámetros FC/FD empleados para evaluar su actividad antibacteriana y los correspondientes criterios de eficacia (Van Bambeke *et al*, 1999; Picco *et al*, 2009).

| Antimicrobiano | Actividad | Semivida de eliminación (horas) | Índice FC / FD | Criterio de eficacia |
|---|---|---|---|---|
| ***β-lactámicos*** | | | | |
| Penicilinas | Tiempo dependiente | 1,5 - 2 | **T > CIM** | > 50% (óptimo 80%) |
| Cefalosporinas | | 1 - 1,5 | | |
| Carbapenems | | 0,9 - 1 | | |
| ***Macrólidos*** | | | | |
| Eritromicina | Tiempo dependiente | 1,5 - 2 | **T > CIM** | > 50% (óptimo 80%) |
| Azitromicina | | ± 15 | **ABC/CIM** | No establecido |
| ***Glicopéptidos*** | | | | |
| Vancomicina | Tiempo dependiente | 5 - 6 | **ABC/CIM** | No establecido |
| ***Tetraciclinas*** | | | | |
| Doxiciclina | Tiempo dependiente | 16 - 18 | **ABC/CIM** | No establecido |
| Minociclina | | | | |
| ***Aminoglucósidos*** | | | | |
| Gentamicina | Concentración dependiente | 1,5 - 2 | **Cmax/CIM** ABC/CIM | ± 8 - 10 |
| ***Fluoroquinolonas*** | | | | |
| Ciprofloxacina | Concentración dependiente | 4 - 5 | Cmax/CIM **ABC/CIM o ABIC** | ≥ 125 |

Los parámetros FC / FD mas empleados se señalan en negrita.

Los β-lactámicos, al igual que los macrólidos, también tienen un comportamiento tiempo dependiente, pero por poseer generalmente una semivida de eliminación corta (1 a 2 h), el mejor indicador de eficacia antibacteriana es el parámetro T > CIM (Van Bambeke *et al*, 1999). Dicho parámetro FC / FD se puede expresar en horas o bien, como el porcentaje del tiempo entre administraciones en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la CIM. En el caso de las penicilinas y las cefalosporinas, se considera adecuado un T > CIM cuando es superior al 50% para garantizar el éxito terapéutico, y es óptimo en un 80% del intervalo entre dosis adecuado (Toutain *et al*, 2002).

No es conveniente que el T > CIM sea superior a este último porcentaje, es decir que las concentraciones se mantengan sobre la CIM en forma sostenida en todo el tratamiento, debido que para que los β-lactámicos puedan actuar las bacterias deben hallarse en fase de crecimiento. Esto significa que la actividad de estos ATMs se manifiesta justamente en

el momento en que sus concentraciones comienzan a disminuir debajo de la CIM, y justifica la necesidad de disponer entre administraciones, de un período de concentraciones sub-CIM que permitan a las bacterias reiniciar su fase de crecimiento y de esa manera, ser susceptibles a la segunda dosis y así sucesivamente hasta disminuir la carga bacteriana (Odenholt, 2001, Picco *et al*, 2009).

Además, existen evidencias de efectos sub-CIM que dañan a las bacterias de manera no letal. En general son alteraciones morfológicas (como consecuencia de perturbaciones metabólicas) responsables en la mayoría de los casos de la disminución de su capacidad de adherencia, patogenicidad y virulencia, e incluso se tornan más susceptibles a la acción de los leucocitos (Lorian, 1975; Odenholt, 2001). Pese a ello, tampoco se debe exagerar el tiempo sin exposición a los β-lactámicos, debido al breve o prácticamente nulo efecto postantibiótico (EPA) que experimentan, a excepción de los anaerobios gramnegativos donde el EPA puede incrementarse hasta casi 12 h (Aldridge, 2002).

De acuerdo a lo expuesto se fundamenta para los β-lactámicos los esquemas posológicos intermitentes, con concentraciones fluctuantes en el tiempo en torno a la CIM, aunque como siempre, existen las excepciones.

Trabajos realizados en personas indican que sería conveniente que se mantengan concentraciones sostenidas de β-lactámicos sobre la CIM durante todo el tratamiento (es decir T > CIM del 100 %). Al respecto, en una revisión realizada por Kasiakou *et al* (2005) se concluye que la infusión continua o prolongada con ATMs con actividad tiempo dependiente tendría beneficios clínicos sobre la administración intermitente.

Sin embargo, recientemente en 2011, MacGowan hace la observación que las administraciones contínuas no ofrecerían mayores ventajas sobre las intermitentes y que no se debería hacer una generalización al respecto, ya que tales ventajas surgen de trabajos donde se hacen ensayos pre-clínicos o estudios poblacionales y es muy probable que se escojan incorrectamente los puntos de corte de las CIM, (muchas veces se toman valores muchos más altos que los realmente necesarios), o que los casos clínicos elegidos no son los adecuados para percibir los beneficios de las terapias continuas, o bien debido a la variabilidad farmacocinética individual existente.

Concluyendo, el criterio de administración intermitente o contínua con β-lactámicos es justificable de acuerdo a cada caso en particular. Inclusive, la administración a niveles sostenidos por sobre la CIM no sólo sería prudente, sino que incluso conveniente, en aquellos pacientes considerados como de alto riesgo. Tales son los casos de los individuos que cursen con enfermedades crónicas, que posean compromisos inmunitarios

o los que posean cuadros septicémicos, con meningitis, osteomielitis y endocarditis, entre otros (Picco *et al*, 2009).

## I.3.- Cefquinoma

### I.3.1.- Consideraciones generales

Las cefalosporinas son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, que es producida por el hongo *Cephalosporium acremonium*. Existen diferentes generaciones que reflejan en parte su espectro *in vitro*, sus similitudes estructurales y en cierta medida, el tiempo de introducción al mercado

La cefquinoma (CFQ) es una cefalosporina de cuarta generación de uso exclusivo en veterinaria. Es un polvo cristalino blanco o amarillento, inodoro y muy soluble en agua, que hasta el momento sólo se comercializa bajo la forma de preparados de aplicación intravenosa (equinos), intramuscular (bovinos y porcinos) subcutánea (bovinos) e intramamaria para la aplicación en bovinos. Es bactericida y se caracteriza por su amplio espectro antimicrobiano y por su elevada estabilidad frente a betalactamasas (EMEA, 1995).

Todas las cefalosporinas verdaderas (o cefemes) contienen el núcleo ácido 7 – aminocefalosporánico, que consiste en un anillo dihidrotiazinico de seis miembros fusionado con un anillo β-lactámico de cuatro miembros (figura 6.d). Otros compuestos que se consideran dentro del grupo son las cefamicinas, que estructuralmente son muy similares a las cefalosporinas, pero poseen un grupo metoxi en posición 7 del anillo cefalosporánico y derivan de diversas especies de *Streptomyces* sp (ej. cefotetan, cefoxitina), o pueden ser productos semisintéticos sustituyendo el azufre con el oxigeno como ocurre con latamoxef (también denominado moxalactam) (Prescott, 2006).

El anillo β-lactámico (figura 6.a) es esencial para la actividad antibacteriana de estas moléculas y que también lo poseen otros ATMs como las penicilinas o penames (figura 6.c) (tales como la penicilina, meticilina, cloxacilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina, carbenicilina, y temocilina), los monobactámicos (aztreonam) y los cabapenemes (imipenem y meropenem). El β-lactámico, también está presente en los inhibidores de betalactamasas tales como las sulfonas del ácido penicilánico (sulbactam, tazobactam) y el ácido clavulánico, que se utilizan para potenciar la acción de otros β-lactámicos (Hornish y Kotarski, 2002).

Dado que el anillo β-lactámico, es esencial para la actividad biológica de estos compuestos, la escisión en cualquier punto de este anillo, resulta en la pérdida completa

de la actividad antibacteriana. La sustitución de varios grupos a nivel de $R_1$, $R_2$, $R_3$ y $R_4$ (figura 6.e) de la estructura básica de las cefalosporinas ha generado una amplia variedad de compuestos con diferencias en el espectro de actividad y en varias propiedades, incluyendo a la farmacocinética, disponibilidad por vía oral, la estabilidad a la hidrólisis por betalactamasas, la afinidad a unión con proteínas y de diferentes sensibilidades químicas. Las diferentes sales que forma, como las bases sódicas y los clorhidratos ácidos se solubilizan mejor en agua que las formas anfóteras.

En la CFQ adquieren importancia para la actividad microbiológica (ver más adelante) los grupos químicos aminotiazolil, ciclohexenopiridina y metoximino (figura 6.f).

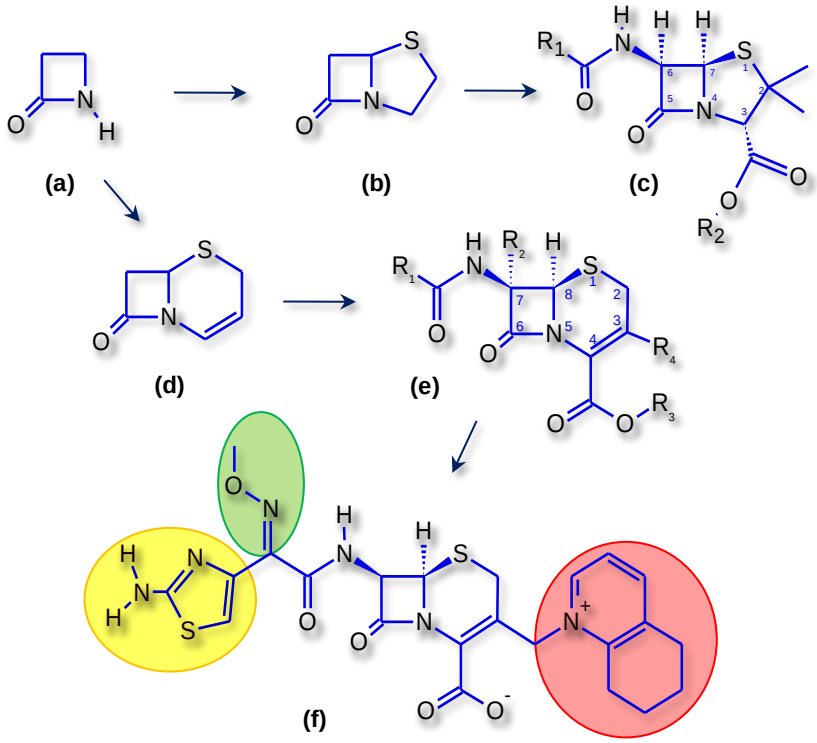



Figura 6: Estructuras β-lactámicas: (a) Anillo β-lactámico; (b) Núcleo penam; (c) Penicilinas; (d) Núcleo cefem; (e) Cefalosporinas y cefamicinas; (f) Cefquinoma, en la que se resaltan los grupos aminotiazolil (amarillo), metoximino (verde) y ciclohexenopiridina (rojo).

### I.3.2.- De la primera generación de cefalosporinas a la cefquinoma

Cada ATM β-lactámico posee sustituciones únicas en su estructura básica, que le confieren una afinidad en los diferentes sitios diana (descripto a continuación en el mecanismo de acción) de cada especie bacteriana. Esta variación es la base principal para los diferentes espectros *in vitro* de actividad antibacteriana. En el caso de las

bacterias Gram negativas, las sustituciones sobre el anillo β-lactámico también confieren capacidades diferenciales de las cefalosporinas para penetrar a través de la membrana externa y acceder a los lugares de acción (Hornish y Kotarski, 2002).

Las cefalosporinas fueron originalmente introducidas para el tratamiento de infecciones producidas por estafilococos resistentes (productores de penicinilasas), con la ventaja que estos fármacos poseían también un espectro de actividad similar contra Gram negativos, tal como las aminobenzilpenicicilinas de espectro ampliado. Las alteraciones de las cadenas laterales sobre el núcleo del ácido 7-aminocefalosporánico y el descubrimiento de las cefamicinas condujeron a una creciente estabilidad frente a las betalactamasas de las bacterias gramnegativas, incluyendo *Bacteroides fragilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este incremento en la estabilidad por lo usual es a expensas de reducir la actividad contra grampositivas y variación en la farmacocinética (Prescott, 2006).

Las diferentes generaciones de cefalosporinas (tabla 4) evolucionaron según las necesidades clínicas, reflejando en parte su espectro *in vitro*, sus similitudes estructurales y en cierta medida, el tiempo de introducción al mercado (Hornish y Kotarski, 2002; Prescott, 2006; Papich y Riviere, 2009).

Tabla 4: clasificación clásica de las cefalosporinas según generaciones.

| Generación de cefalosporinas | | | |
|---|---|---|---|
| **PRIMERA** | **SEGUNDA** | **TERCERA** | **CUARTA** |
| Cefalexina a, b, c | Cefaclor a, b | Cefoperazona b, c | Cefepima b |
| Cefradina a, b | Cefuroxima a, b | Ceftiofur b, c | Cefpiroma a, b |
| Cefacetrilo b, c | Cefalonio b, c | Cefbuperazona a | Cefquinoma b, c |
| Cefapirina b, c | Cefprozil a | Cefdinir a | |
| Cefadroxilo a | Loracarbef a | Cefetamet a | |
| Cefaloglicina a | Cefamandol b | Cefixima a | |
| Cefaloridina b | Cefmetazol b | Cefpodoxima a | |
| Cefalotina b | Cefonicida b | Ceftibuten a | |
| Cefazolina b | Ceforanida b | Cefmenoxima b | |
| | Cefotetam b | Cefotaxima b | |
| | Cefoxitina b | Cefsulodina b | |
| | | Ceftazidima b | |
| | | Ceftizoxima b | |
| | | Ceftriaxona b | |
| | | Latamoxef b | |

a, b y c indican las vías de administración oral, inyectable e intramamaria, respectivamente.

Las cefalosporinas de primera generación son generalmente activas contra cocos Gram positivos, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* productores y no productores de penicilinasas, y estreptocos del grupo A y B hemolítico. En general, las cefalosporinas de esta generación poseen limitada efectividad contra bacterias Gram negativas.

Las de segunda generación son activas contra las mismas cepas que son susceptibles las de primera generación, pero se les ha ampliado el espectro frente a diversos organismos, tales como *Haemophilus influenzae*, y algunas Gram negativas, aunque el rango para las mismas es limitado.

Las cefalosporinas de tercera generación fueron diseñadas para tener mayor actividad contra bacterias Gram negativas y mantener una buena actividad contra Gram positivas, aunque son generalmente menos efectivas contra estafilococos susceptibles a las cefalosporinas de primera generación. Compuestos de esta clase han mejorado la estabilidad hidrolítica a muchas de las betalactamasas activas frente a la cefalosporinas de generaciones anteriores y penicilina. Las cadenas laterales oximino, presentes en la mayoría de las cefalosporinas de tercera generación, fueron introducidas para conferir estabilidad al anillo β-lactámico frente a ciertas betalactamasas que surgieron a raíz de la presión selectiva ejercida por el uso de la ampicilina, carbenicilina, y cefalosporinas de primera y segunda generación en la década de 1960 (Hornish y Kotarski, 2002 ).

La cuarta generación de cefalosporinas, donde se encuentra la CFQ, incorpora diferentes grupos activos en su estructura, particularmente un grupo con amonio cuaternario en la posición C-3 del núcleo ácido aminocefalosporánico que le confiere al grupo una mayor potencia hacia una amplia gama de microorganismos e inclusive una mayor actividad contra bacterias sensibles a las cefalosporinas de tercera generación. Tienen un espectro ampliado de actividad contra Gram negativas en comparación a otras clases de las cefalosporinas (El-Gendy *et al*, 2009).

Existe una quinta generación de cefalosporinas utilizada en medicina humana, que incluyen a ceftobiprol y a ceftarolina (Kollef, 2009), con amplia actividad frente Gram negativas y Gram positivas, incluyendo las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Pseudomonas aeruginosa*.

### I.3.3.- Mecanismo de acción

La CFQ ejerce su efecto antibacteriano impidiendo y alterado la síntesis de la pared celular bacteriana con una acción bactericida tiempo-dependiente, tal como se comentó en apartados anteriores.

El mecanismo de acción deriva de la unión covalente del β-lactámico al sitio activo de las enzimas denominadas PBPs (*penicillin binding proteins*). Esta unión es debida a la similitud estructural de la CFQ por los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) que une las moléculas de peptidoglicano de la pared bacteriana.

Además, induce la activación de autolisinas bacterianas que destruyen el peptidoglicano (Mella *et al*, 2001). La resultante del mecanismo de acción es la lisis osmótica y consiguiente muerte bacteriana.

Se destaca que este mecanismo no es exclusivo de la CFQ, sino que es compartido con otros β-lactámicos. Sin embargo, algunas de las diferencias en el espectro de acción pueden ser explicadas por las afinidades a las PBPs, debido a que en una bacteria pueden existir entre 2 a 8 PBPs con funciones diferentes. Así el complejo PBP-1 posee una actividad bioquímica de transglicosilasa, la PBP-3 tiene funciones de transpeptidasas y los complejos PBP-4, -5 y -6 de carboxipeptidasas (Mella *et al*, 2001). Se ha documentado que la inhibición de la PBP-1a y -1b generalmente causa lisis (esta actividad se regisra por ejemplo para los carbapenemes), de la PBP-2 da lugar a células redondeadas llamadas “esferoblastos” y la inhibición de la PBP-3 produce formas filamentosas alargadas. En líneas generales los β-lactámicos son afines a las PBP-1, -2 o -3, y en especial para cefalosporinas los grupos de PBP-2 y -3 (Papich y Riviere, 2009).

Con el fin de llegar al sitio de acción, los β-lactámicos deben penetrar la membrana externa bacteriana, y lo hacen a través de una proteína porina que está normalmente presente en las bacterias para permitir que los nutrientes ingresen en la célula. Debido a la diferencia estructural es más fácil el ingreso en las Gram positivas que las Gram negativas. Los fármacos más eficaces contra las bacterias gramnegativas son los que rápidamente pueden penetrar la membrana externa de la pared celular, como es el caso de la CFQ.

### I.3.4.- Espectro de acción de la cefquinoma. Relación estructura - actividad

En lo que se refiere específicamente a la CFQ, los grupos químicos involucrados para su actividad antibacteriana son el aminotiazolil y, particularmente, el grupo ciclohexenopiridina (figura 6.f). La presencia del nitrógeno cuaternario en este último grupo mantiene la carga positiva tanto en condiciones de pH ácido como alcalino. La asociación de esta carga neta positiva con una carga negativa a nivel del C4 del núcleo cefem hace que este ATM se comporte como *zwitterión*, es decir que en condiciones *in vivo* la molécula mantenga un equilibrio entre sus cargas. Esta característica químico-estructural explica el hecho que la CFQ presente una penetración a través de las porinas bacterianas superior a sus congéneres de tercera generación, lo que le permite alcanzar altas concentraciones en el espacio periplásmico de bacilos Gram negativos (Mella *et al*, 2001; El-Gendy *et al*, 2009).

Sin embargo, el solo aumento de la penetración intracelular, no explica en forma exclusiva la importante actividad antibacteriana de estos compuestos, particularmente sobre bacterias resistentes a los β-lactámicos. Así, la cefaloridina que estructuralmente también es una molécula dipolar, sin carga neta, con un amonio cuaternario en C3, presenta una penetración intracelular incluso superior a la CFQ; sin embargo, al carecer del radical metoxiimino no presenta una adecuada estabilidad frente a betalactamasas, siendo rápidamente degradada. Por lo tanto otro aspecto relevante para explicar la mayor actividad de la CFQ sobre bacterias Gram negativas resistentes a moléculas de tercera generación, es la estabilidad frente a las betalactamasas, tanto cromosomales como plasmidiales y su afinidad las PBP (Mella *et al*, 2001).

En forma general y práctica puede señalarse que el espectro de actividad antimicrobiana de la CFQ involucra a una amplia gama de bacteria Gram positivas, que incluyen a *Streptococcus spp, S. aureus* (meticilino sensibles) y despliegan una actividad superior a las cefalosporinas de tercera generación sobre bacilos Gram negativos multiresistentes (*Salmonella spp, Escherichia coli, Klebsiella spp, Proteus mirabilis, Enterobacteriaceae spp, Pasteurella spp, Citrobacter spp, Serratia marcescens)* y equivalente al de estos compuestos de tercera generación sobre cepas de bacterias Gram negativos susceptibles como por ejemplo *Actinobacillus equuli* y *Arcanobacterium pyogenes* (Limbert *et al*, 1991; Böttner *et al*, 1995; Fung-Tomc, 1997; Deshpande *et al*, 2000; Guérin-Faublée *et al*, 2002; San Martín *et al*, 2002; Guérin-Faublée *et al*, 2003; Wallmann *et al*, 2003; Sheldon *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2006; Melnikow *et al*, 2008; Russi *et al*, 2008, Zonca *et al*, 2011; Katsuda *et al*, 2012).

Mientras tanto *Pseudomonas aeruginosa, S. aureus* resistente a meticilina y *Rhodococcus equi* presentaron moderada sensibilidad frente a CFQ en los estudios realizados por Limbert *et al* (1991), Thomas *et al* (2006) y Aarestrup y Skov (2010).

Los anaerobios resultan ser sensibles a la CFQ, pero sólo las cepas Gram positivas (*Peptostreptococcus anaerobius, Propinobacterium acnes* y *Clostridium spp*) (Limbert *et al*, 1991; Thomas *et al*, 2006) y no las Gram negativas, tales como *Bacteroides* spp y *Fusobacterium* spp, que demostraron en el 80 % de los casos una CIM fue superior a 100 µg/ml (Limbert *et al*, 1991). Del mismo modo Sheldon *et al* (2004) informaron una $CIM_{90}$ superior a los 32 µg/ml en 22 cepas de *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus* aisladas de muestras uterinas de vacas postparto con pirexia y/o metritis y/o endometritis.

### I.3.5.- Resistencia

Existe abundante información de la emergencia de resistencia bacteriana frente a las cefalosporinas, aunque momentáneamente es poca la descripta para la CFQ. El documento EMEA/CVMP/SAGAM/81730/2006-CONSULTATION, publicado en febrero de 2008 por la Agencia Europea del Medicamento, menciona la importancia del control y seguimiento de la emergencia de resistencias frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, por el impacto tanto en la salud animal como humana. La preocupación surge de la intensificación del uso de estos ATMs y por el rápido incremento de resistencia en los seres humanos. La evidencia disponible indica que la resistencia a estas generaciones de cefalosporinas también está surgiendo en las poblaciones animales.

Si bien se mencionó la importancia estructural de la CFQ frente a las de betalactamasas, es de destacar que existe una amplia variedad de estas enzimas (Singh, 2009) y, si bien la CFQ resiste a la mayoría de ellas (como las de grupo AmpC que incluyen entre otras las betalactamasas *ACC, ACT, CMY, DHA,* familia *FOX*, familia *LAT, MIR, MOX*), puede resultar susceptible a las denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE (*TEM, SHV* y *CTX-M* entre otras) son secretadas por bacterias Gram negativas como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae,* y los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Jacoby y Munoz-Price, 2005).

Aunque hay muchas incertidumbres, las consecuencias potenciales de un aumento de la resistencia tipo BLEE en las bacterias que colonizan animales son graves (EMEA, 2008). Los genes que codifican BLEE se asocian a menudo con estructuras genéticas que son muy móviles (como plásmidos, transposones e integrones) (Jacoby y Munoz-Price, 2005), permitiendo una rápida diseminación de los mismos con la consecuente expresión de resistencia.

Al respecto, para determinar la probabilidad de desarrollo de resistencia a la CFQ (y otras cafalosporinas de cuarta generación) con el uso clínico, se han llevado a cabo estudios que examinan las tasas de aislamiento de mutantes resistentes después de una exposición única o repetida a estos agentes. Sin embargo, es de destacar que estos estudios *in vitro* sólo pueden evaluar la resistencia por mutación cromosómica pero no la adquirida por elementos genéticos como por las cepas que proucen BLEE, dependiendo este último tipo de resistencia de la prevalencia de dichas cepas localizadadas en una zona geográfica (Fung-Tomc, 1997).

Además existen otros mecanismos de resistencia, independientes de betalactamasas, como lo son la disminución del ingreso de ATMs a través de la membrana celular externa (Gram negativas) por reestructuración de la conformación de la proteína porina

(mecanismo aún no descripto para CFQ pero si para otros ATM β-lactámicos), y la modificación del sitio diana (PBP) (Papich y Riviere, 2009). Este último mecanismo suele ser utilizado por los estafilococos meticilino resistentes (*MRSA*) para los diferentes β-lactámicos (Li *et al*, 2007). El gen *mecA*, que codifica este mecanismo, está localizado como parte del *cromosoma cassette de estafilococo*, el cual es transferible horizontalmente entre las diferentes cepas de estafilococos presentes en personas y animales (Deurenberg *et al*, 2007).

### I.3.6.- Farmacocinética de la la cefquinoma y otras cefalosporinas

La farmacocinética de la CFQ ha sido descripta en cerdos, caballos, vacas, ovejas tras la administración intravenosa, intamuscular e incluso intramamaria, pero no por administración oral ya que no se absorbe en forma entérica.

Consideramos importante la descripción farmacocinética de las diferentes cefalosporinas para poder realizar una comparación con la de la CFQ a fin de enriquecer los datos existentes con las diversas fuentes bibliográficas.

Absorción

Como se observa en la tabla 4, no todas las cefalosporinas (incluyedo la CFQ) son aptas para la administración oral, debido a la limitada absorción en el tracto intestinal y consecuente baja biodisponibilidad, producto del carácter hidrosoluble y polar de estas sustancias.

Sin embargo, la incorporación de grupos electronegativos en las moléculas mejora la estabilidad en el medio ácido y permite la absorción entérica (50 a 95 %) de cefalexina, cefadroxilo, cefradina y cefaclor en pequeños animales (Waterman y Scharfenberger 1978; Lavy *et al*, 1997; Campbell y Rosin, 1998), aunque no lo hacen con tanta eficiencia en grandes animales. Así por ejemplo, se puede constatar que en perros la cefalexina tiene una biodisponibiliad oral entre el 50 y 75 % (Lavy *et al*, 1997; Carli *et al* 1999), un 56 % en gatos (Wackowiez *et al*, 1997) y tan solo un 5 % en equinos (Davis *et al*, 2005).

Formulaciones de cefalosporinas bajo la forma de éster mejoran la liposolubilidad como la cefpodoxima proxetilo, favoreciendo la absorción entérica luego de ser administrados vía oral (Campbell y Rosin, 1998). Otro caso que mejora la biodisponibilidad *per os*, lo constituye el éster de la cefuroxima, denominado cefuroxima axetilo, un profármaco que se activa luego de su hidrólisis en la mucosa intestinal e hígado (Prescott, 2006).

En algunos casos, la absorción puede ser favorecida con el alimento, tal como lo demuestra el estudio desarrollado por Campbell y Rosin (1998) con cefadroxilo en perros. El carácter mayormente lipofílico de este ATM colabora en este efecto, alcanzando elevadas concentraciones plasmáticas luego de las comidas. Otras cefalosporinas que se absorben favorecidas por la presencia de alimentos son la cefixima y el cefetamet.

Por otra parte, y como se mencionó en el apartado I.2.1, la edad puede condicionar la absorción entérica, tal como se observó con la administración oral de cefadroxilo en equinos, con mejor biodisponibildad en potrillos que en adultos (Wilson *et al*, 1985; Duffee *et al*, 1989), probablemente influenciado por las diferencias de pH en el tubo digestivo, ya que los primeros son animales lactantes con predomino de un medio ácido, a diferencia de los segundos cuyo pH es mas alcalino.

El conjunto de cefalosporinas inyectables difiere escasamente en la absorción parenteral, aunque la estabilidad y unión a las proteínas tisulares son variables condicionando a la misma. Tras la aplicación intramuscular y/o subcutánea la absorción varía entre un 60 y 100%, con picos de concentración plasmática máximos entre 30 y 60 minutos post-administración. Así por ejemplo tras la administración intramuscular de cefotaxima (Atef *et al*, 1990), cefuroxima (El-Sooud *et al*, 2000) y ceftriaxona (Ismail, 2005) en cabras se observó una biodisponiblidad del 100, 90 y 85 %, respectivamente. En bovinos, la cefalexina se absorbió en un 68 % por la misma vía (Soback *et al*, 1988), mientras que en equinos la cefapirina (Brown *et al*, 1986) y la cefoxitina (Brown *et al*, 1987), lo hicieron en un 95 y 77 %, respectivamente.

La CFQ luego de la administración intramuscular y subcutánea en bovinos se absorbió con relativa rapidez (el pico de concentraciones séricas se alcanzó entre las 0,5 y 2 horas) (EMEA, 1995), y en equinos la biodisponibilidad fue del 98 % (EMEA, 2003).

Tras la administración intramuscular de CFQ en cerdos, la concentración mínima inhibitoria en el plasma se alcanzó después de tres minutos (Lohr *et al*, 2004).

Sólo una pequeña fracción de CFQ administrada en forma intramamaria se absorbió a nivel sistémico (EMEA 1995).

Distribución

Las cefalosporinas son moléculas ácidas por lo que en el organismo se comportan como moléculas polares. Son muy poco liposolubles y poseen una capacidad deficiente para

penetrar las células. El volumen de distribución generalmente está comprendido entre 200 a 300 ml/kg y raramente exceden los 500 ml/kg.

La CFQ no es la excepción; su distribución no es amplia debido a que es un ácido orgánico con valores de pKa de 2,71 ± 0,2 y su solubilidad en lípidos es baja lo que limita el transporte a través de la bicapa lipídica celular. En los perros el volumen aparente de distribución en el estado de equilibrio es de 200 ml/kg mientras que en caballos, cerdos y vacunos dicho volumen de distribución es de 240, 230 y 210 ml/kg, respectivamente (Limbert *et al*, 1991; EMEA, 1995; Winther *et al*, 2011).

Sin embargo las cefalosporinas tienen una muy buena distribución en los líquidos extracelulares, debido a su baja unión a proteínas plasmáticas en animales. La CFQ se une entre un 5 al 15 % variando este pequeño porcentaje en bovinos, caninos, porcinos y ovinos (Limert *et al*, 1991; EMEA, 1995; Lohr *et al*, 2004; Tohamy, 2011), aunque Winther *et al* (2011) informan un 20 a 30 % en equinos.

A diferencia de lo que sucede en animales, existen evidencias que la unión a las proteínas plasmáticas de muchas cefalosporinas es elevada en seres humanos. La ceftriaxona, posee un 90 a 95 % de unión a proteínas plasmáticas en personas mientras que en perros posee sólo un 25 % de unión a bajas concentraciones y un 2 % a elevadas concentraciones (Popick *et al*, 1987; Papich *et al*, 2010). La cefazolina posee un elevado porcentaje de unión en personas (85 %), pero es bajo en perros (19 %) favoreciendo una rápida distribución desde el plasma al líquido intersticial (Rosin *et al*, 1993).

El mayor porcentaje de unión a proteínas del plasma en animales ocurre con cefovecina, el cual se une un 99 % en perros y gatos (Stegemann *et al*, 2006a y 2006b). Sólo la pequeña fracción libre de cefovecina es capaz de filtrarse por el glomérulo. Pero inclusive de lo filtrado, una parte puede ser reabsorbida, favoreciendo aun más la semivida de 7 días en gatos y 5 días en perros. Esto determina concentraciones tisulares mantenidas, y efectivas, de al menos 14 días para cefovecina en perros y gatos.

La distribución de las cefalosporinas es limitada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y las concentraciones en este líquido corresponden a un 0,5 a 2 % de las concentraciones máximas logradas en sangre. Esto es debido a las características físico-químicas de las cefalosporinas y si logran alcanzan el LCR, son transportadas activamente fuera del sistema nervioso central. Sin embargo, este mecanismo se interrumpe en el caso de inflamación meníngea. Además la meningitis, altera las uniones celulares estrechas, el transporte de vesículas, y por lo tanto el pasaje de moléculas betalactámicas a través de la barrera hematoencefálica (BHE) se ve favorecida, logrando concentraciones del 55 % respecto al pico de concentración plasmática (Dowling y Kruth, 2006).

Las excepciones al paso limitado a través de la BHE las constituyen principalmente algunas cefalosporinas de tercera generación (Nau *et al*, 2010). Así cefaloridina, latamoxef y ceftriaxona logran niveles elevados en SNC, éstos son menores con cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima ó cefuroxima y variables para el resto. Ceftiofur ingresa en cantidad limitada, aún en presencia de meningitis.

Las cefalosporinas difunden bien en el sistema respiratorio; la CFQ consigue concentraciones superiores a la $CIM_{90}$ de patógenos pulmonares como *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Böttner *et al*, 1995; Sellyei *et al* 2009); mientras que la concentraciones máximas detectadas en las secreciones bronquiales de cefoxitina y cefradina equivalen al 20% de las plasmáticas (Bergogne-Berezin *et al*, 1978).

En los huesos, articulaciones y músculo, la distribución es aceptable para todo el grupo, aunque es inferior con agentes de tercera generación. La cefazolina penetra en el hueso normal y osteomielítico, y las concentraciones son similares a las plasmáticas (Daly *et al*, 1982). Esto determina el uso efectivo de cefazolina para la prevención y tratamiento de osteomielitis y es el ATM de uso más común para procedimientos ortopédicos (Rosin *et al*, 1993).

La cefapirina y el ceftiofur, experimentan gran disposición en los líquidos intraperitoneal y sinovial (Schurman *et al*, 1976; Brown *et al*, 1991; Meyer *et al*, 2009). La ceftazidima, ceftizoxima y cefuroxima generan niveles terapéuticos en el ojo (Barza *et al*, 1993) y la cefoperazona, cefalexina, cefotaxima y cefradina en el oído medio (Aslam *et al*, 2004). En la piel, la disposición es adecuada con la cefalexina y cefadroxilo y con los agentes de tercera generación, en particular el latamoxef (Frank y Kunkle, 1993).

En los aparatos digestivo y urinario todo el grupo genera concentraciones terapéuticas, especialmente en orina, debido a que es la principal vía de excreción, donde exceden 100 veces la concentración máxima plasmática.

La distribución de cefalosporinas hacia la glándula mamaria y el consecuente acceso a la leche es limitada, y corresponde a lo explicado en el apartado I.2.1 referente a la lactancia. El ceftiofur, aplicado por vía intramuscular aún en dosis muy elevadas, consigue en la glándula mamaria bovina niveles ATMs insuficientes. La CFQ no debería ser la excepción a las cefalosporinas, pero está indicada para la mastitis bovina producida por *E. coli*, (administrada vía intramuscular cada 12 h) lo que indica el paso de la misma hacia la leche bovina (Errecalde *et al*, 2007).

Eliminación

En cuanto a la biotransformación, las cefalosporinas son mínimamente metabolizadas en el hígado, dependiendo del fármaco. Agentes como la cefotaxima, cefacetrilo, cefalotina y cefapirina se metabolizan por esterasas que escinden grupos 3-acetoximetil del anillo dihidrotiazínico, convirtiéndolas en lactonas inactivas. Los compuestos desacetilados se eliminan principalmente por orina, conservando cierta actividad antibacteriana.

En bovinos y porcinos, el ceftiofur primero es degradado por esterasas y luego conjugado, generando los metabolitos: desfuroil-ceftiofur-glutation-disulfuro (hígado), 3-3-desfuroil-ceftiofur-disulfuro (orina) y desfuroil-ceftiofur-cisteína-disulfuro (plasma, tejidos y orina) (Jones, 1989; Hornish y Kotarski, 2002).

Las cefalosporinas son rápidamente eliminadas luego de su administración sistémica. El órgano principal de excreción es el riñón, y las concentraciones urinarias de estas moléculas son elevadas. La filtración glomerular y la secreción tubular conforman los principales mecanismos de eliminación de cefalosporinas (Papich y Riviere, 2009).

En general, poseen semividas de 1 a 2 horas, pero algunas (particularmente de tercera generación), pueden tener una semivida más prologada posiblemente por la limitada secreción tubular, elevada afinidad por las proteínas plasmáticas y mínima degradación. Por ejemplo, el ceftiofur se metaboliza en un metabolito activo y tiene una semivida de 3 a 4 h en bovinos, 4 h en perros y 2,5 h en caballos. Otras cefalosporinas de tercera generación con semividas más prolongadas se comprueba en compuestos que incorporan en el C3 del anillo β-lactámico estructuras de 3 ó 4 átomos de nitrógeno, como ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima y latamoxef (Hornish y Kotarski, 2002; Papich y Riviere, 2009).

La reducción de la función renal impone un ajuste en el régimen de dosificación, debido a la importancia de la eliminación urinaria, excepto para compuestos que se metabolizan o eliminan principalmente por bilis. En general aquellos compuestos de elevado peso molecular y gran afinidad proteica, como la cefoperazona, son excretados por la bilis en gran medida (75%). Otros compuestos que se eliminan por esta vía en gran proporción son la ceftriaxona y el latamoxef, motivo por el cual están contraindicados en el equino y otros herbívoros con intestino grueso expandido. La alteración hepática no requiere el ajuste de dosis, puesto que la menor excreción biliar se compensa con mayor eliminación urinaria; el ajuste sólo es indispensable cuando coexisten ambas patologías (Prescott, 2006; Errecalde *et al*, 2007).

En cuanto a la CFQ, sólo se metaboliza en pequeña medida, excretándose al igual que la mayoría de los β-lactámicos fundamentalmente a través del riñón. Esto se comprobó utilizando el ATM radiomarcado ($^{14}C$), y el único compuesto identificado positivamente en bovinos tratados fue la CFQ, sin modificaciones, excretado por orina. En terneros un 50 – 80 % de la dosis se recuperó en la orina dentro de 4 primeras horas, y el 90% dentro de las 24 horas, mientras que un 5% de la dosis fue de recuperada de las heces. (EMEA 1995). En porcinos se recuperó un 89 % de la CFQ en orina, luego de la administración IM, y un 95 % a las 48 h; el resto fue excretado por las heces (EMEA, 1998).

Limbert *et al* (1991), evaluaron la eliminación de la CFQ en perros, bovinos y porcinos en dosis comprendidas entre 5 y 20 mg/kg por las vías intravenosa, intramuscular y subcutánea y en general se alcanzaron valores de semivida entre 1 y 2 horas con aclaramiento plasmático promedio de 160 ml·kg/h.

En equinos, se realizó un estudio farmacocinético con CFQ administrada por vía intramuscular e intravenosa a la dosis única de 1 mg/Kg. Después de la administración intravenosa el aclaramiento plasmático se estimó en 103,8 ml·kg/h y la semivida de eliminación fue de 2,17 horas. Después de la administración IM, el aclaramiento plasmático se estimó en 107,4 ml·kg/h y la semivida de eliminación fue de 1,98 horas. Estos valores son comparables a los obtenidos en ganado bovino (EMEA, 2003).

De acuerdo a los valores de estos parámetros, en líneas generales se puede decir que la cinética de eliminación de CFQ en estas especies es similar a la de otras cefalosporinas.

### I.3.7.- Usos clínicos de la cefquinoma

El uso clínico de la CFQ está condicionado por la sensibilidad el microorganismo y la localización del foco infeccioso.

Las diferentes sensibilidades fueron demostradas por estudios desarrollados *in vitro* y/o *in vivo* experimentadas en bovinos (Amiridis *et al*, 2003; Ganière *et al*, 2004; Sheldon *et al*, 2004; Palanivel *et al*, 2005; Bradley *et al*, 2011), bubalinos (Palanivel *et al*, 2005), porcinos (Wisselink *et al*, 2006; Cavaco *et al*, 2008; Sellyei *et al*, 2009; Stannarius *et al*, 2009), equinos (Thomas *et al*, 2006; Rohdich *et al*, 2009), caninos (Ganière *et al*, 2005) y en pollos (El-Gendy *et al*, 2009; Sellyei *et al*, 2009) con diferentes afecciones como mastitis bovina, endometritis, pododermatitis, enfermedades digestivas, respiratorias y septicemias en potrillos.

En bovinos se recomienda para enfermedades respiratorias (causadas por *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*), dermatitis digital, panadizo interdigital y mastitis aguda hacia *E. coli* con signos de afectación sistémica. Además, para mastitis bovina a bacterias susceptibles, existe un preparado comercial para la administración intramamaria.

Los preparados intravenosos son recomendados, entre otros, para los cuadros septicémicos, fundamentalmente en animales jóvenes, como los potrillos y terneros.

La CFQ se propuso para su empelo en enfermedades respiratorias porcinas a la dosis de 2 mg/kg IM una vez al día durante 3 a 5 días (EMEA, 1998). En esta especie también se recomienda el síndrome mastitis-metritis-agalactia y, al igual que el bovino, para mastitis producida por *E. coli*.

Parlevliet *et al* (2008), sugieren el empleo de CFQ intrauterina en yeguas (1,5 g / 33 ml diluyente) para el tratamiento de la endometritis crónica (cada 24 h y durante 3 días), y en una sola administración como coadyuvante en el tratamiento de la endometritis inducida por apareamiento continuo.

La CFQ también se ha utilizado como antibiótico en el diluyente del semen equino, no habiendo afectado negativamente a los parámetros seminales (Parlevliet *et al*. 2006).

### I.3.8.- Toxicidad de la cefquinoma

Al igual que resto de los β-lactámicos, la CFQ posee un amplio margen de seguridad, siendo su toxicidad aguda baja (EMEA, 1995).

Tras la exposición a dosis repetidas y crecientes, sólo se observó anemia hemolítica en ratones, en la dosis de 2500 mg/kg/día *per os* administrada durante 90 días. No se observaron alteraciones reproductivas, teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas, ni sobre el sistema inmunológico (EMEA, 1995).

En los diferentes trabajos de investigación donde han utilizado CFQ, hasta el momento, no se han descripto reacciones de toxicidad, ni efectos colaterales.

Las recomendaciones y precauciones para su uso, están más bien relacionadas a las probables reacciones de hipersensibilidad, así como su uso terapéutico racional (no preventivo), para evitar la emergencia de resistencia bacteriana.

# II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El caprino, en Argentina, es una especie de producción alternativa al tradicional bovino, en regiones donde el escenario geográfico y medioambiental, y por ende el sistema de cría en extensivo, no permiten cubrir las necesidades nutricionales del ganado vacuno. Es el caso de la zona norte de la provincia de Córdoba, donde los productores se dedican a la cría del cabrito para consumo. En los últimos diez años, la política del Gobierno Provincial ha sido incentivar la producción de leche en esta especie, para incrementar la sostenibilidad y el desarrollo económico regional. Sin embargo, debido a que la sanidad de los hatos de dichas explotaciones, en general, es deficiente, se evidencian una serie de enfermedades que disminuye la producción, no haciéndola rentable. Los problemas sanitarios de índole infecciosa involucran a los aparatos respiratorio, digestivo, reproductor y en los tambos, la mastitis, cuya incidencia va en aumento. La aplicación de antimicrobianos, conlleva una reducción de pérdidas económicas y un incremento del bienestar animal; aunque hay que tener en cuenta que el uso indiscriminado o no racional de estos agentes puede generar problemas tales como falta de eficacia, presencia de residuos en la leche y un incremento en la aparición de resistencias bacterianas, que no sólo repercuten en los animales sino también en la población humana.

Una opción terapéutica eficaz frente a las patologías bacterianas de frecuente aparición en los caprinos son los β-lactámicos. En el caso de este trabajo de tesis se eligió la cefquinoma (CFQ), una cefalosporina de cuarta generación de uso exclusivo en veterinaria, con actividad bactericida frente a una amplia variedad de microorganismos Gram positivos y negativos, y resistente a la inactivación por betalactamasas, que ha sido un factor substancial limitante a la terapéutica con cefalosporinas de generaciones anteriores.

La CFQ, al igual que el resto de β-lactámicos, interfiere con la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular, tras la interacción con las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs). Sin embargo su mecanismo de acción se ve fortalecido por sus propiedades físico-químicas; por un lado se comporta como *zwitterión*, cualidad que favorece el ingreso inmediato a través de membranas bacterianas, inclusive porinas de la pared celular. Además, la introducción de un grupo metoximino-aminotiazolil en posición siete de la cadena lateral incrementa la afinidad por las PBPs y extiende el espectro, fundamentalmente sobre bacterias Gram negativas, en tanto los grupos polares incorporados en posición tres intensifican la actividad sobre estreptococos y pseudomonas.

Las indicaciones de la CFQ abarcan las enfermedades producidas por patógenos sensibles a la misma, que afectan al tracto respiratorio y reproductor (mastitis aguda, metritis) o causan septicemia, entre otras patologías. Sin embargo, la mayoría de estos estudios de eficacia están realizados en especies que no incluyen a la caprina. Clásicamente las recomendaciones terapéuticas para una especie rumiante se podía extrapolar al resto de ellas, pero numerosos trabajos han puesto de manifiesto las importantes diferencias entre especies, que hacen necesarios estudios individualizados para reducir o minimizar los fallos terapéuticos, los efectos tóxicos o el aumento de resistencias.

Tradicionalmente, para evitar estos problemas se llevaban a cabo una serie de estudios farmacocinéticos (FC) que permitían conocer las concentraciones del fármaco en la especie seleccionada. Sin embargo recientemente se han desarrollado estudios conjuntos de FC y farmacodinamia (FD) (enfoque FC/FD) que permiten, no solo conocer los perfiles de concentraciones, sino establecer o seleccionar regímenes terapéuticos adecuados a cada caso y a su vez evitar los problemas antes mencionados, fundamentalmente de resistencia bacteriana.

El parámetro FD que se utiliza para definir esta relación es la concentración inhibitoria mínima (CIM), e indica la sensibilidad del microorganismo causante de la infección (en una especie concreta en una región determinada) frente a un antibiótico específico.

Las diferencias en la intensidad y duración de los efectos producidos por un fármaco, entre las diferentes etapas de la vida o estados fisiológicos, como diferencia de edad los adultos y neonatos, o entre hembras preñadas (en diferentes estadios de gestación) y animales no gestantes, así como en animales en períodos de lactación y no lactantes, suelen ser atribuidas a cambios hemodinámicos, metabólicos y a los perfiles de excreción renal, entre los más frecuentes. Estas variaciones fisiológicas, pueden afectar el perfil de concentración plasmático del fármaco y por ende las concentraciones en el sitio diana donde actuará el mismo, que en el caso de los antimicrobianos es el lugar donde asienta la infección.

En el enfoque integrado FC/FD se evalúa la eficacia de un antimicrobiano según si su actividad bactericida o bacteriostática depende de las veces que supere la CIM (antimicrobianos concentración dependientes) o del porcentaje de tiempo con relación al intervalo de administración que esté sobre la CIM (antimicrobianos tiempo dependientes), tal como ocurre con los β-lactámicos. El parámetro de eficacia FC/FD empleado para estos últimos es el tiempo en que el antimicrobiano se encuentra sobre la CIM (T > CIM).

Por lo expuesto, el objetivo general de esta tesis es investigar la farmacocinética de la CFQ en cabras, en diferentes etapas de desarrollo (cabritos de 3, 10, 24, 50, 80 días, y cabras adultas no lactantes ni gestantes) y estadíos fisiológicos como son la gestación y la lactación. Como objetivos particulares se citan los siguientes:

- Puesta a punto y validación de la técnica analítica de detección y cuantificación de CFQ mediante cromatografía liquida de alta eficacia, en suero y leche caprina.
- Describir y analizar la farmacocinética de la CFQ por las vías intravenosa e intramuscular en cabras adultas no lactantes ni gestantes (vacías).
- Describir y analizar la farmacocinética de la CFQ por las vías intravenosa e intramuscular en cabras gestantes.
- Evaluar el paso de CFQ a través de la placenta caprina.
- Describir y analizar la farmacocinética de la CFQ por las vías intravenosa, intramuscular e intramamaria en cabras lactantes.
- Describir y analizar la farmacocinética de la CFQ por las vías intravenosa en caprinos en diferentes etapas de su desarrollo 3, 10, 24, 50 y 80 días.
- Evaluar la influencia de la edad, gestación y/o lactancia sobre el comportamiento farmacocinético de la CFQ en cabras.
- Determinar la prevalencia de mastitis subclínica producidas por estafilococos coagulasa negativos (ECN) en hatos caprinos del norte de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Cuantificar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CFQ frente a los ECN de mastitis subclínica en las cabras de los hatos localizados en el norte de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Calcular el predictor de eficacia farmacocinético / farmacodinámico (T > CIM) para CFQ en mastitis subclínicas producidas por ECN en cabras, localizadas en el norte de la provincia de Córdoba.
- Calcular el parámetro de eficacia T > CIM para CFQ en cabras, teniendo en cuenta los diferentes estados fisiológicos (cabras vacías, gestantes, lactantes y cabritos en desarrollo) y las CIMs de los patógenos habituales en caprinos.

# III.- MATERIAL Y MÉTODOS

# III.- MATERIAL Y MÉTODOS

De acuerdo a la descripción de los objetivos particulares se ha propuesto, para evaluar la CFQ, el siguiente esquema de trabajo por etapas:

- Etapa I: Farmacocinética en cabras adultas no gestantes ni lactantes (vías IV e IM).
- Etapa II: Farmacocinética de CFQ en cabras gestantes.
    - II.a.: Farmacocinética tras la administración IV e IM.
    - II.b.: Evaluación del paso de CFQ a través de la placenta.
- Etapa III: Farmacocinética de CFQ en cabras lactantes
    - III.a.: Farmacocinética tras la administración IV e IM.
    - III.b.: Farmacocinética tras la administración intramamaria (IMM)
- Etapa IV: Farmacocinética de CFQ en cabritos de diferentes edades (vía IV).
- Etapa V: Farmacodinamia: aislamiento e identificación de estafilococos coagulasa negativos (ECN) en mastitis subclínicas caprinas y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CFQ.

La descripción de los materiales incluye a los animales, los fármacos, los materiales utilizados (durante las tomas de muestras, transporte y su procesamiento en laboratorio) y el equipamiento empleado en estas cinco etapas.

Por su parte en la metodología se describe la realización de cada etapa, las diferentes técnicas analíticas empleadas en el laboratorio, el procesamiento farmacocinético y estadístico de los datos, así como la integración de los parámetros farmacocinéticos con los obtenidos por farmacodinamia a través del dato de la CIM.

## III.1.- MATERIALES

### III.1.1.- Animales

Para los muestreos en las etapas I a IV (tablas 5 a 10), se utilizaron cabras (*Capra aegagrus hircus*) sanas, de raza Anglo Nubian, sin antecedentes de medicación antimicrobiana (ni de ningún otro tipo) en el mes previo de los ensayos, localizadas en el tambo caprino experimental de Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), Argentina.

Las cabras lactantes incluidas en la etapa III, tenían sus medios mamarios clínicamente sanos y con aislamiento bacteriano negativo en la leche.

Por otra parte, para los muestreos de la etapa V, se emplearon cabras en lactación procedentes de establecimientos localizados en el norte de la provincia de Córdoba, Argentina (tabla 12), donde las razas principales son la Anglo Nubian y Criolla. Estos animales suelen ser ordeñados rutinariamente, en forma manual, una vez al día y con una producción láctea diaria entre 1 a 2 litros.

El número de animales asignados a cada etapa fue de seis, a excepción de la etapa V donde se tomaron muestras de 651 animales.

Tabla 5: Datos de los caprinos (hembras raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa I.

| Animal n° | Identificación por etapa | Edad (años) | Peso (kg) |
|---|---|---|---|
| **1** | A | 4 | 50 |
| **2** | B | 2 | 57 |
| **3** | C | 2 | 40 |
| **4** | D | 5 | 45 |
| **5** | H | 2 | 47 |
| **6** | W | 5 | 47 |

Tabla 6: Datos de los caprinos (raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa IIa.

| Animal n° | Identificación por etapa | Edad (años) | Peso (kg) | Semanas gestación | Número de fetos |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | F | 4 | 58 | 13 | 3 |
| **2** | G | 2 | 58 | 14 | 1 |
| **4** | J | 5 | 48 | 14 | 2 |
| **5** | K | 2 | 49 | 13 | 1 |
| **6** | M | 5 | 49 | 12 | 1 |
| **7** | L | 5 | 47 | 11 | 1 |

Tabla 7: Datos de los caprinos (raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa IIb.

| Animal n° | Identificación por etapa | Edad (años) | Peso (kg) | Número de crías |
|---|---|---|---|---|
| **1** | I | 4 | 64 | 3 |
| **2** | N | 2 | 60 | 1 |
| **6** | R | 5 | 52 | 1 |
| **8** | X | 5 | 59 | 2 |
| **9** | O | 4 | 49 | 2 |
| **10** | S | 5 | 50 | 2 |

Tabla 8: Datos de los caprinos (raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa IIIa.

| Animal n° | Identificación por etapa | Edad (años) | Peso (kg) | Producción leche / día (lts) | Días de lactación |
|---|---|---|---|---|---|
| **4** | T | 5 | 50 | 1,2 | 18 |
| **5** | U | 2 | 53 | 1,7 | 36 |
| **7** | Z | 5 | 45 | 2 | 42 |
| **8** | Q | 5 | 50 | 2 | 28 |
| **11** | E | 3 | 45 | 1 | 42 |
| **12** | R | 2 | 42 | 1 | 26 |

Tabla 9: Datos de los caprinos (raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa IIIb.

| Animal n° | Identificación por etapa | Edad (años) | Peso (kg) | Producción leche / día (lts) | Días de lactación |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Q | 4 | 52 | 1,4 | 157 |
| **2** | U | 2 | 55 | 1,1 | 196 |
| **3** | R | 2 | 45 | 0,8 | 197 |
| **4** | T | 5 | 45 | 0,9 | 155 |
| **5** | Z | 2 | 52 | 1 | 202 |
| **6** | E | 5 | 48 | 1,2 | 141 |

Tabla 10: Datos de los caprinos (raza Anglo Nubian) utilizados en la etapa IV.

| Animal n° | Identificación por etapa | Sexo | Peso (kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 días | 10 días | 24 días | 50 días | 80 días |
| **13** | J | macho | 2,0 | 3,5 | 6,0 | 7,5 | 12,0 |
| **14** | A | macho | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 9,5 | 17,0 |
| **15** | V | hembra | 4,0 | 5,0 | 8,1 | 14,0 | 18,7 |
| **16** | I | macho | 4,0 | 5,0 | 9,0 | 14,5 | 20,2 |
| **17** | E | hembra | 4,5 | 5,1 | 9,3 | 11,8 | 15,7 |
| **18** | R | macho | 3,6 | 4,6 | 6,2 | 10,6 | 14,3 |

### III.1.2.- Fármacos

Se utilizaron tres presentaciones comerciales de cefquinoma (CFQ base, como sal sulfato) del laboratorio Intervet (Intervet International, Heideblick-Beesdau, Brandenburg, Alemania):

- Cobactan IV. Solución inyectable. Frasco con 1,35 g de CFQ base para reconstituir con 30 ml de solvente. Lotes n° A104A01 y A105A02.
- Cobactan 2,5 %. Suspensión inyectable. Frasco de 100 ml con 25 mg de CFQ base. Lotes n° A130A01 y A247A02.
- Cobactan LC. Pomos (jeringas) intramamarios. Cada jeringa de 8 g, contiene 75 mg de CFQ base. Lote n° A183A01.

Además para la confección de los patrones para el análisis cromatográfico y las diluciones para la determinación de la CIM, se empleó sulfato de CFQ como fármaco puro (lote nº 01-01), provista por el laboratorio Intervet International.

Por otra parte, para la sincronización de los celos de las cabras se utilizaron los siguientes medicamentos del laboratorio Syntex S.A.:

- Progespon. Esponjas vaginales con 60 mg de acetato de medroxiprogeterona.
- Novormon 5000. Frasco de 25 ml con 5000 UI de gonadotrofina coriónica equina (PMSG).
- Ciclase DL. Frasco de 100 ml con 7,5 mg de (+) cloprostenol (análogo sintético de la prostaglandina F2α).

Para la etapa IIb, se emplearon los siguientes agentes anestésicos inyectables:

- Xilacina 20 (Laboratorio Richmond Vet Pharma, Argentina). Frasco con 100 ml de clorhidrato de xilacina (2 %).
- Fentanilo Dosa 50 (Laboratorio Dosa, Argentina). Ampolla con 1 ml de citrato de fentanilo (50 µg/ml).
- Diprivan (Laboratorio Astrazeneca, Argentina). Ampolla con 20 ml de propofol (10 mg/ml).
- Lidocaíne (Laboratorio Richmond Vet Pharma, Argentina). Frasco con 100 ml de clorhidrato de lidocaína (2 %).

### III.1.3.- Materiales utilizados en los muestreos

Los materiales empleados en las diferentes tomas de muestras, transporte y almacenamiento en el laboratorio fueron los siguientes:

- Jeringas y agujas estériles descartables (3 y 5 ml)
- Alcohol 90º
- Algodón hidrófilo
- Gradillas
- Guantes de látex descartables
- Tubos de centrífuga descartables con tapas, identificados
- Cajas isotérmicas de poliestireno y geles refrigerantes
- Reloj digital

- Planillas de muestreo
- Puntas para micropipeta de 200 y 1000 µl
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Cajas porta-tubos eppendorf
- Sogas

Además, se utilizó instrumental quirúrgico para las tomas de muestras de la etapa IIb.

Por otra parte para la toma de muestras de leche, además se emplearon:

- Alcohol 70º
- Botellas plásticas (500 y 1500 ml) descartables con tapa a rosca
- Frascos de 40 ml con tapa hermética, identificados
- Tubos de 15 ml con tapa a rosca, estériles

### III.1.4.- Materiales utilizados en el laboratorio

Para las etapas I a IV durante la fase extractiva de CFQ de las distintas muestras e inyección en el equipo cromatográfico, se empleó:

- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC. (Baker, USA)
- Acido Fosfórico (85%, δ: 1,7). (Sigma Aldrich, Argentina)
- Agua ultrapura. Milli Q Plus System. (Millipore, USA)
- Cloroformo grado HPLC. (Sintorgan, Argentina)
- Hidróxido de tetraetilamonio 20%. (Sigma Aldrich, Argentina)
- Solución reguladora de pH (4 y 7). Solución reguladora de pH (4 y 7)
- Filtros Durapore HVLP 01300. (Millipore, USA)
- Filtros Durapore HVLP 04700. (Millipore, USA)
- Portafiltros Swinnex SX000 1300. (Millipore. USA)
- Tubos eppendorf x 2 ml
- Jeringa de 100 µl punta roma. (Hamilton, USA)
- Material de vidrio diverso (erlenmeyers, matraces aforados, pipetas, etc)

Para la etapa V se empleó:

- Caldo Infusión Cerebro Corazón (Laboratorio Britania, Buenos Aires)
- Caldo tripteína de soja (Difco, USA)
- Agar Mueller Hinton (Merck Chemicals, Alemania)
- Cepa control *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould 305)
- Cepa control *S. aureus* ATCC 29213
- Solución reguladora de pH (4 y 7)
- Glicerol al 10%
- Tubos tapa a rosca estériles
- Placas de Petri descartables x 10 cm diámetro
- Material de vidrio diverso (erlenmeyers, matraces aforados, pipetas, etc)

### III.1.5.- Equipamiento

El equipamiento común a todas las etapas ha sido el siguiente:

- Agitador vortex (CKTech VI - 2, Argentina)
- Balanza analítica; sensibilidad 0,1 mg (Ohaus Adventurer AR2140, USA)
- Balanza portátil; sensibilidad 0,1 g (Ohaus CS 200, USA)
- Balanza para los animales (20g - 200 kg) (BalanCor, Argentina)
- Baño termostático (Mod. Masson. Vicking, Argentina)
- Centrífuga de 14.000 rpm (Gelec G. 130D, Agentina)
- Centrífuga de 3.600 rpm (Rolco 2036, Argentina)
- Micropipetas automáticas volumen variable de 10 a 100 µl y de 100 a 1000 µl (Socorex, Argentina)
- Baño de ultrasonido (Fischer Scientific FS 28, USA)
- Purificador de agua (Millipore, USA)
- Peachímetro con electrodo pH/ATC (Denver Instrument UB-10, USA)
- Neveras y congeladores

El equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* o HPLC) y sus componentes ha sido el siguiente:

- Bomba LC 10 AS (Shimadzu, Japón)
- Detector ultravioleta SPD 10 A (Shimadzu, Japón)
- Integrador Shimadzu C-RGA (Shimadzu, Japón)
- Ordenador y Software cromatográfico Clarity SW (DataApex, República Checa)
- Horno de columna cromatográfica (Zelec ZC 90, Argentina)
- Precolumna de fase reversa. ProntoSIL Spheribond ODS 2: 5 µm, 20 x 4 mm. (Bischoff Cromatography, Alemania)
- Columna de fase reversa. ProntoSIL Spheribond ODS 2: 5 µm, 150 x 4,6 mm. (Bischoff Cromatography, Alemania)

Para la etapa V, se empleó:

- Autoclave VZ100 tipo Chamberland (Argentina)
- Aparato Multi-inoculador bacteriano de Steers-Foltz
- Densitómetro (Densimat, BioMérieux; Francia)
- Estufa de cultivo (Faeta; Argentina)

Por último, se mencionan equipos que se emplearon para alguna etapa en particular:

- Ecógrafo portátil (Mindray DP- 2200; España), con transductor rectal; para realizar las ecografías de las hembras gestantes durante la etapa IIa.
- Monitor multiparamétrico (Feas LCD; Argentina); para monitorizar el plano anestésico y las diferentes constantes fisiológicas en las cabras de la etapa IIb.
- Mezclador stomacher y microbolsas (Seward Stomacher 80 biomaster, Reino Unido); para la homogeneización del cotiledón placentario de la etapa IIb.

## III.2.- METODOS

### III.2.1.- Diseño experimental

El diseño del experimento consistió en dividir a los ensayos en las cinco etapas que se han mencionado previamente.

Las administraciones de CFQ fueron por vía intravenosa (IV) para las etapas I, IIa, IIb, IIIa y IV, intramuscular (IM) para las etapas I, IIa y IIIa, e intramamaria (IMM) para la etapa IIIb

(tabla 11). Para las vías IV e IM se utilizaron en todos los casos dosis únicas de 2 mg/kg de peso, mientras que para la vía IMM, se administraron 10 mg por cada medio mamario, cada 12 h, en un total de 3 administraciones.

Tabla 11: Descripción, vías de administración y dosificación de las etapas (I a IV) en el estudio de la cefquinoma en cabras.

| ETAPA | DESCRIPCIÓN | VÍA (*) | DOSIS |
|---|---|---|---|
| **I** | Farmacocinética en adultas no gestantes ni lactantes | IV, IM | 2 mg/kg |
| **II** | Gestantes | | |
| **a** | Farmacocinética | IV, IM | 2 mg/kg |
| **b** | Paso por placenta | IV | 2 mg/kg |
| **III** | Lactantes | | |
| **a** | Farmacocinética | IV, IM | 2 mg/kg |
| **b** | Farmacocinética | IMM | 10 mg/medio mamario cada 12 h (tres aplicaciones en total) |
| **IV** | Farmacocinética en diferentes edades | IV | 2 mg/kg |

**(*)** IV, IM e IMM: vías intravenosa, intramuscular e intramamaria, respectivamente.

En las etapas I, IIa y IIIa se emplearon seis cabras, en un diseño cruzado (3x2), para lo cual se repartieron los animales en forma aleatoria en dos subgrupos (tres animales en cada uno), administrándose a uno de ellos la CFQ por vía intramuscular (IM) y al otro por vía intravenosa (IV). Transcurrido un período de quince días, se repitió el estudio, administrándose el fármaco en cada grupo por la vía faltante.

Para la vía IV se utilizó la presentación comercial Cobactan IV, para la IM Cobactan 2,5 %, y para la IMM Cobactan LC.

#### III.2.1.1.- Etapa I: Farmacocinética de cefquinoma en cabras adultas no gestantes ni lactantes

El grupo de animales se seleccionó de un lote homogéneo de cabras adultas no lactantes. La condición de no gestante (vacía) se constató mediante ecografía. Además, por historial clínico se verificó que ningún animal hubiera recibido tratamiento previo con ATMs u otros fármacos al menos un mes antes de comenzar con el estudio. Todos los animales adultos estaban vacunados y desparasitados acorde a los pautas establecidas para las diferentes especies sitas en la el Campo Experimental de la FCA, UCC.

El día previo al ensayo, las cabras se encerraron en un corral apartado, se les realizó el corte de pelo en la zona de las yugulares, y se les dejó en disponibilidad heno y agua *ad libitum.* Además en ese día, se preparó todo el material necesario para el muestreo.

El día del ensayo, se comenzó pesando los animales para calcular la dosis total a administrar. Luego, previo a la administración del fármaco, se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular derecha, con el objetivo de analizarla y verificar la ausencia de medicación antimicrobiana que pudiera interferir con el ensayo. Inmediatamente, se administró el preparado comercial, a la dosis y vías mencionadas (tabla 11). La sangre se extrajo a los 2, 6, 12, 20, 30, 45 y 60 minutos postadministración para la vía IV, y a los 10, 20, 30, 45 y 60 minutos para la vía IM, continuándose luego a las 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas, para ambas vías. En todos los casos se utilizó la vena yugular, teniendo en cuenta que en la administración IV se sacara la sangre desde la vena contralateral a la que se empleó para administrar el medicamento.

Todas las muestras se colocaron en tubos de plástico desechables para centrífuga, correctamente identificados alfanuméricamente y con tapa. Los mismos se fueron colocando en gradillas y éstas a su vez, dentro de cajas isotérmicas con geles refrigerantes, hasta el momento de extraerles el suero en el laboratorio. En este último, los tubos se colocaron en baño térmico a 38°C durante 45 minutos, para favorecer la retracción del coágulo, luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, y el suero sobrenadante se separó con ayuda de una micropipeta, colocándoselo finalmente en un tubo eppendorf de 2 ml convenientemente rotulado (con la identificación que corresponde a esta etapa; tabla 5). Los tubos correspondientes a cada grupo de animales se acomodaron dentro de una caja porta-tubos eppendorf, rotulada y finalmente se congeló a – 20°C hasta el momento de su análisis (el tiempo entre obtención y análisis no superó los 2 meses).

#### III.2.1.2.- Etapa IIa: Cefquinoma en cabras gestantes

Para esta etapa, se sincronizaron los ciclos reproductivos en forma artificial, según el siguiente protocolo, recomendado por Freitas *et al* (2004):

- Día 0: se colocaron esponjas intravaginales con 60 mg medroxiprogesterona acetato.
- Día 9: se administraron 300 UI de PMSG y 50 $\mu$g de prostaglandina F2$\alpha$ por vía IM.
- Día 11: se retiraron las esponjas intravaginales.
- Día 12 a 15: se colocaron las hembras junto al macho cabrío para la detección de los celos y los servicios.

Posteriormente se realizaron estudios ecográficos para confirmar la preñez y la evolución de la misma. Finalmente se procedió al ensayo farmacocinético en las cabras que presentaban una gestación comprendida entre el segundo y último tercio (específicamente se emplearon las cabras con 11 a 14 semanas de gestación; tabla 6).

El esquema de administración IV e IM de CFQ (diseño cruzado 3x2), como la toma de muestras y separación del suero, fue el mismo que en la etapa I.

#### III.2.1.3.- Etapa IIb: Evaluación del paso de la cefquinoma a través de la placenta

Esta etapa fue ejecutada mediante operación cesárea, con los animales que presentaron preñez a término, confirmados por estudio ecográfico.

Las cirugías se realizaron en el quirófano del Hospital Veterinario de la Universidad Católica de Córdoba participando cirujanos, anestesistas y asistentes neonatólogos del mencionado Hospital.

El abordaje quirúrgico se realizó por acceso paramediano abdominal ventral según la técnica sugerida por Tibary y Van Metre (2005), con el animal en decúbito lateral derecho.

El protocolo anestésico consistió en la administración de 0,01 mg/kg IM de xilacina para el efecto tranquilizante, además de 1 µg/kg IV de fentanilo seguido por la inducción con propofol a la dosis de 6 mg/kg IV. Una vez inconsciente el animal se procedió a la colocación 2 ml/10 kg de lidocaína al 2 % por la técnica epidural, en el espacio lumbosacro. En todo momento los parámetros cardiovasculares, respiratorios y de saturación de oxígeno en sangre fueron evaluados con monitor multiparamétrico.

Una vez finalizada la cirugía las madres fueron ubicadas junto a sus crías en parideras acondicionadas para tal fin. Las madres fueron monitorizadas mediante observación clínica diaria durante la semana posterior al acto quirúrgico. A los 10 días se extrajeron los puntos de la cirugía a todas las hembras.

El protocolo de administración de CFQ y toma de muestras fue el siguiente:

- Pre administración de CFQ: toma de muestra de la sangre materna (vena yugular). Tranquilización del animal con xilacina.
- Minuto 0: administración de 2 mg/kg de CFQ vía IV (vena yugular).
- Minuto 30 ± 6 (n = 6): toma de muestras de la sangre materna (vena mamaria).

- Minuto 31 ± 6 (n = 6): anestesia inyectable (fentanilo, propofol y lidocaína según protocolo descripto previamente) e inicio del acto quirúrgico.
- Minuto 40 ± 7 (n = 6): toma de muestra del líquido amniótico.
- Minuto 43 ± 7 (n = 6): toma de muestra de la sangre fetal (vena umbilical).
- Minuto 45 ± 7 (n = 6): toma de muestra del cotiledón placentario.

Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración (4°C) e inmediatamente se les realizó un tratamiento antes de congelarlas y conservarlas hasta el procedimiento extractivo. De esta forma, a las muestras de sangre (madres e hijos) se las trató de la misma manera que las de la etapa I, para obtener el suero. El líquido amniótico fue homogeneizado en agitador vortex durante 5 minutos, separándose 2 ml del sobrenadante en tubos eppendorf. Por otra parte el cotiledón placentario se colocó en una bolsa (Microbag) la cual se colocó en un stomacher donde se lo trituró y mezcló; el homogeneizado resultante se fraccionó en tubos eppendorf de 2 ml.

Todos los tubos con sus muestras, se acomodaron dentro de una caja porta-tubos eppendorf, con su correspondiente identificación, y finalmente se congelaron a – 20°C hasta el momento de su análisis.

#### III.2.1.4.- Etapa IIIa: Farmacocinética de cefquinoma tras la administración IV e IM en cabras lactantes

Las características de las cabras, en cuanto a producción y días en lactancia luego del parto, se observan en la tabla 8.

El diseño cruzado para la administración de 2 mg/kg CFQ vías IV e IM, como así también el procedimiento de extracción de las muestras de sangre, los tiempos, la separación y conservación del suero, fueron similares a los de la etapa I (*vide supra*).

Además en esta etapa de estudio, conjuntamente a las muestras de sangre, se obtuvieron muestras de leche, previo estudio clínico de la glándula mamaria. En el mismo día del muestreo y antes de la administración de CFQ, se procedió a la toma de muestras de leche de cada medio mamario, para evaluación microbiológica, según procedimientos asépticos recomendados por Oliver *et al* (2004). Para esto se procedió a desinfectar el extremo del pezón con alcohol 70°, se eliminaron los primeros chorros de leche del medio mamario y finalmente, se colocaron en un tubo estéril aproximadamente 5 ml de leche. Acto seguido se procedió al ordeño total de la glándula mamaria; la leche fue recolectada

en botellas plásticas desechables (identificadas por cada animal). Se evaluó el aspecto macroscópico de la leche y se midió el volumen total producido y el pH de la misma.

Luego de la administración de la CFQ, se procedió a tomar muestras de leche a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h. En todos los casos la glándula mamaria (los dos medios) fue ordeñada totalmente, recolectándose el total de lo producido en una botella y midiéndose el volumen tal como fue descripto previamente; también se procedió a la medición del pH (además de la muestra 0) a las 24 y 48 h. Cada botella se homogeneizó y de cada una se conservaron 5 ml, los que constituyeron la muestra final por tiempo de extracción y animal.

Todas las muestras se congelaron a -20°C, no superando los dos meses desde su recolección hasta su análisis.

#### III.2.1.5.- Etapa IIIb: Farmacocinética de cefquinoma tras la administración IMM en cabras lactantes

Para la realización de esta fase se administró a los 6 animales CFQ por vía IMM del preparado comercial Cobactan® LC.

Dado que dicho preparado es una formulación para administrar en vacas (cada jeringa de 8 g contiene 75 mg de CFQ sulfato), fue necesario fraccionar el contenido para adecuarlo de manera proporcional al peso de las cabras y al volumen de leche que éstas venían produciendo (tabla 9). De esta forma cada jeringa utilizada por nosotros contenía 10 mg de CFQ, cantidad que se administró por cada medio mamario

La misma fue administrada cada 12 h, luego del vaciado de la glándula mamaria, en un total de 3 administraciones. Al igual que la etapa IIIa se tomaron muestras de sangre para extracción de suero, y de leche, utilizando el mismo procedimiento de composición de la muestra (leche de los dos medios mamarios como unidad de muestra) midiéndose el volumen de leche producido y el pH. Asimismo se extrajeron muestras de leche para bacteriología. El protocolo del muestreo se resume en la figura 7.

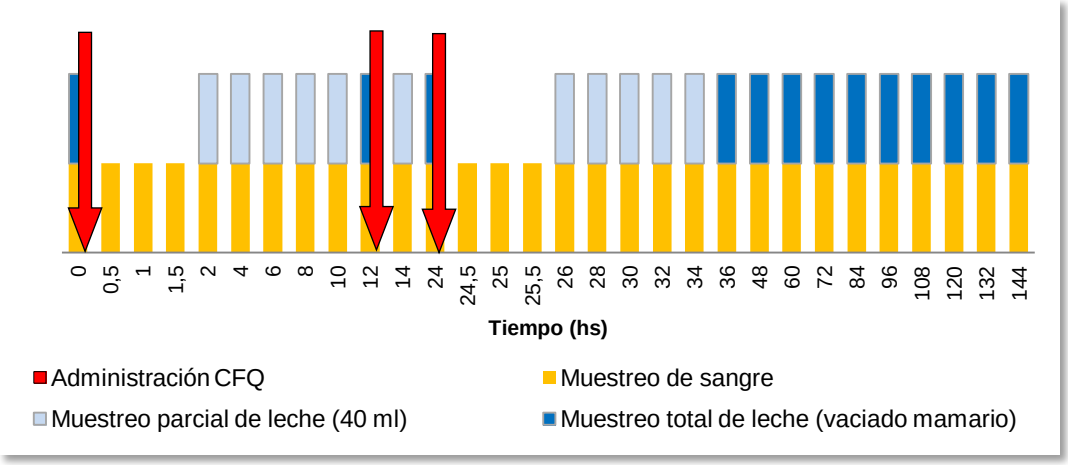



Figura 7: Esquema de muestreo de leche en la etapa IIIb, tras la administración de cefquinoma intramamaria. En todas las muestras de leche se midió el pH y en el ordeño total se midió, además, el volumen producido. Las muestras de leche (asépticas) para evaluación microbiológica se tomaron a las 0 y 36 horas.

### III.2.1.6.- Etapa IV: Farmacocinética de cefquinoma en cabritos a diferentes edades

Para esta fase se emplearon seis cabritos que, a medida que iban creciendo se repetían los ensayos farmacocinéticos. De esta forma, se administró la CFQ por la vía IV en los animales a los 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad (tablas 10 y 11).

El procedimiento de extracción de las muestras de sangre, los tiempos, la separación y conservación del suero, fueron iguales a los de la administración intravenosa de la etapa I (*vide supra*).

### III.2.1.7.- Etapa V: Farmacodinamia: muestreo de leche para el aislamiento de estafilococos coagulasa negativos (ECN) y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma.

El relevamiento se llevó a cabo en 18 tambos pertenecientes a los departamentos de Ischilín, Tulumba y Río Seco, ubicados en la zona norte de la provincia de Córdoba (figura 8).

Tal y como se ha comentado, las razas predominantes en esta zona son la Criolla y la Anglo Nubian. El tipo de ordeño es manual, con una producción láctea diaria por cabra de 1 a 2 litros.

Durante un período de tres meses (diciembre a febrero), se muestrearon por única vez a 651 cabras, lo que representa el 68 % del total de las cabras en ordeño de todos los tambos que se visitaron (tabla 12).

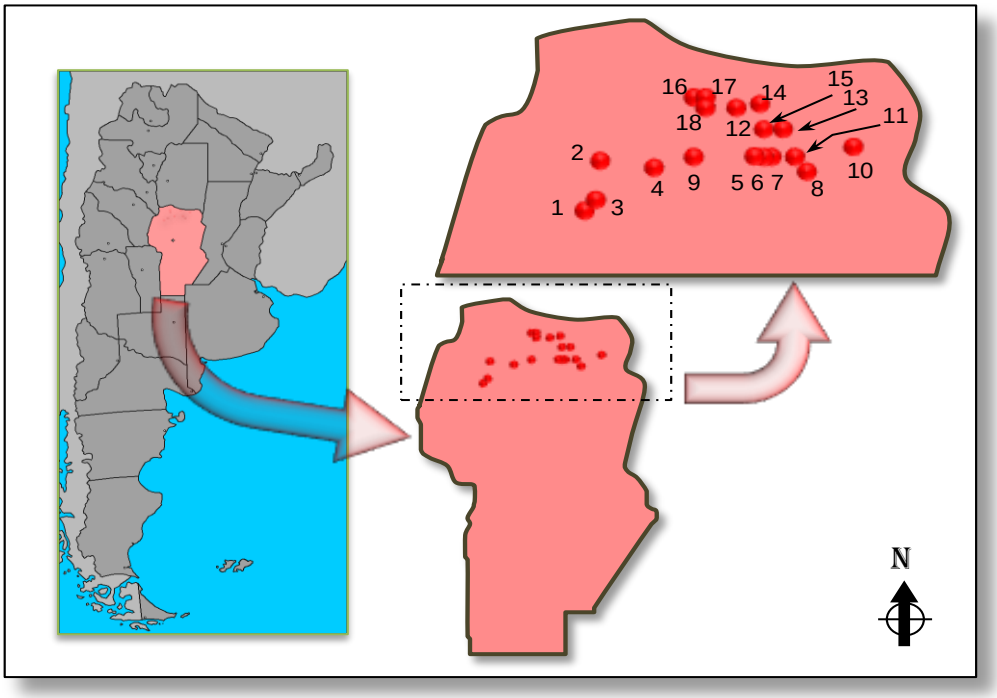



Figura 8: Mapa de la provincia de Córdoba, Argentina, indicando la distribución geográfica de los 18 tambos caprinos (puntos en rojo) de donde se tomaron las muestras de leche de la etapa V. Los números corresponden a los establecimientos identificados en la tabla 12.

Tabla 12: Distribución y cantidad de animales muestreados por localidad.

| Establecimiento N° | Dpto. | Localidad | Animales en ordeño / tambo | Animales muestreados |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Punilla | S. Marcos Sierras | 50 | 49 |
| 2 | Ischilín | Jaime Peter | 36 | 32 |
| 3 | Ischilín | Copacabana | 48 | 28 |
| 4 | Tulumba | El Estanque | 58 | 58 |
| 5 | Tulumba | Las Arrias | 50 | 47 |
| 6 | Tulumba | Las Arrias | 51 | 51 |
| 7 | Tulumba | Las Arrias | 43 | 13 |
| 8 | Tulumba | El Tajamar | 50 | 43 |
| 9 | Tulumba | S. José Dormida | 50 | 29 |
| 10 | Río Seco | Puesto Castro | 70 | 42 |
| 11 | Tulumba | Las Masitas | 100 | 24 |
| 12 | Río Seco | Campo Grande | 80 | 40 |
| 13 | Río Seco | La Encrucijada | 60 | 40 |
| 14 | Río Seco | La Victoria Este | 60 | 22 |
| 15 | Río Seco | Las Maravillas | 79 | 79 |
| 16 | Río Seco | San Pedro | 22 | 22 |
| 17 | Río Seco | San Pedro | 27 | 6 |
| 18 | Río Seco | San Pedro | 26 | 26 |
| | | **Totales** | **960** | **651** |

La toma de muestras se realizó en forma aleatoria sistemática a las cabras en lactación.

En dos de los animales muestreados (uno procedente del establecimiento identificado con el número 1 y el otro del número 2; tabla 12) sólo se pudo extraer la leche del medio mamario izquierdo, debido a que el derecho era afuncional.

Luego de la evaluación clínica de la glándula mamaria, se recolectaron muestras de leche de cada medio (15 ml), obtenidas de forma aséptica de acuerdo con metodología estándar (Oliver *et al*, 2004) y según se indicó precedentemente en la etapa III, para cabras en lactación.

Cada tubo se mantuvo en refrigeración en cajas isotérmicas con geles refrigerantes durante 5 h, hasta remisión al laboratorio, donde se congelaron a – 20°C hasta el momento de su análisis.

### III.2.2.- Metodología analítica

Los laboratorios en donde se realizaron los diferentes análisis de muestras fueron el de Farmacología y Toxicología (etapas I a IV), y el de Enfermedades Infecciosas e Inmunología (etapa V); ambos pertenecientes a la Faculta de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba.

#### III.2.2.1.- Etapas I a IV: Detección y cuantificación de cefquinoma

La detección y cuantificación de CFQ en las muestras de suero y leche se realizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección ultravioleta, con el equipamiento descripto en el apartado III.1.5.

Todas las muestras y estándares fueron analizadas bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Detector: UV; λ: 267 nm
- Volumen de inyección de muestra: 20 µl
- Temperatura de la columna: 36 ± 1 °C
- Flujo: 2 ml/min
- Tiempo de retención para CFQ: 5,8 – 6,5 min

La fase móvil se preparó mezclando agua, acetonitrilo y solución tampón fosfato de tetraetilamonio en proporción 85,5/10/4,5. Esta solución se filtró mediante una membrana

de polivinildenofluoruro (PVDF) con tamaño de poro de 0,45 µm (Durapore HVPL 04700); se desgasificó por sonicación en baño de ultrasonido.

A su vez, la solución tampón fosfato de tetraetilamonio (0,1 M; pH = 5) se preparó disolviendo 20 ml de ácido fosfórico (1 M) en 180 ml de agua ultrapura (calidad HPLC). El pH fue ajustado con hidróxido de tetraetilamonio (20%). Esta solución se mantuvo en condiciones de refrigeración (4°C) durante 2 semanas.

#### III.2.2.1.1.- Técnica extractiva

Previo a la inyección en HPLC, todas las muestras y estándares se purificaron mediante el procedimiento extractivo. A 0,5 ml de fluido biológico (suero, leche, líquido amniótico y homogeneizado de cotiledón, inclusive), se le agregaron de 1,25 ml acetonitrilo. Se centrifugaron (10 minutos a 14000 rpm) y se extrajo el sobrenadante al cual se le adicionó 0,15 ml de la solución tampón fosfato de tetraetilamonio (0,1 M; pH = 5) y 2 ml de cloroformo calidad ultra pura. Posteriormente a su homogeneizado en agitador vortex, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, se separaron 0,8 ml del sobrenadante y se procedió a su filtración con membrana Durapore HVPL 01300.

#### III.2.2.1.2.- Validación del método cromatográfico

Se siguieron los *Procedimientos de validación de métodos analíticos*, GL 2/98, del programa de Cooperación Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos Veterinarios (VICH, 1998).

Se elaboraron unas soluciones estándares de concentración conocida de CFQ en suero y en leche. Las áreas de los picos cromatográficos obtenidas en función de los valores de dichas concentraciones, permitieron la realización de las rectas de calibración, a partir de las cuales se pudieron calcular los valores de precisión y exactitud del método empleado.

Se elaboraron soluciones stock de CFQ en agua, las cuales se mantuvieron fraccionadas en tubos herméticos y congelados a – 20°C. La tabla 13 muestra los valores de concentraciones de estas soluciones, identificadas numéricamente del 1 al 9.

El stock n° 1 se elaboró teniendo en cuenta la pureza de la CFQ sulfato (82,7 % p/p), sustancia provista por Intervet International, y la precisión de la balanza analítica (Ohaus Adventurer AR2140; sensibilidad: 0,0001 g) utilizada para pesar dicha sustancia por única vez. De tal forma que se pesaron 0,0321 g (32,1 mg) de sustancia, que corresponden a

26,547 mg de CFQ. Esta cantidad se disolvió en 25 ml de agua ultra pura, obteniéndose una concentración final de 1062 µg/ml.

La tabla 14 muestra la elaboración de los estándares de CFQ en plasma y en leche, partiendo de las soluciones stock, así como las concentraciones finales.

Tabla 13: Elaboración y concentraciones finales de las soluciones stock de cefquinoma (CFQ) en agua.

| Identificación del stock | N° de stock empleado | Volumen utilizado del stock (ml) | Volumen final de la dilución (ml) | Concentración CFQ (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | - | - | 25 | **1061,868** |
| **2** | 1 | 3 | 5 | **637,121** |
| **3** | 1 | 2 | 5 | **424,747** |
| **4** | 1 | 1 | 5 | **212,374** |
| **5** | 1 | 3 | 25 | **127,424** |
| **6** | 1 | 3 | 50 | **63,712** |
| **7** | 6 | 2 | 10 | **12,742** |
| **8** | 6 | 2 | 50 | **2,548** |
| **9** | 6 | 1 | 50 | **1,274** |

Tabla 14: Elaboración y concentraciones finales de las soluciones estándares de cefquinoma en suero y leche caprino.

| Volumen de suero o leche (ml) [§] | N° de stock empleado | Volumen del stock agregado a [§] (ml) | Concentración del estándar de CFQ en suero o leche (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| **0,5** | 1 | 0,250 | **353,956 *** |
| **0,5** | 1 | 0,100 | **176,978 *** |
| **0,5** | 2 | 0,050 | **57,920 *** |
| **0,5** | 2 | 0,025 | **30,339** |
| **0,5** | 3 | 0,025 | **20,226** |
| **0,5** | 4 | 0,025 | **10,113** |
| **0,5** | 5 | 0,025 | **6,068** |
| **0,5** | 6 | 0,025 | **3,034** |
| **0,5** | 6 | 0,010 | **1,249** |
| **0,5** | 7 | 0,025 | **0,607** |
| **0,5** | 8 | 0,025 | **0,121** |
| **0,5** | 8 | 0,015 | **0,074** |
| **0,5** | 9 | 0,015 | **0,037** |

(*): Sólo utilizados para leche.

Los intervalos de concentraciones empleados para la elaboración de las rectas de calibración, para suero y leche, se muestran en la tabla 15. Debido a las amplias diferencias de concentraciones (entre la mayor y la menor) y con el objeto de no incluir un

sesgo en el cálculo del coeficiente de regresión, se emplearon diferentes intervalos para leche o suero, según correspondiera.

Tabla 15: Intervalos de concentraciones empleados para la construcción de las rectas de calibración, en suero y leche caprino.

| | Concentraciones (µg/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Bajas** | **Altas** | **Superiores** | **Total** |
| **Suero** | 0,037 – 1,249 | 1,249 – 30,339 | - | 0,037 - 30,339 |
| **Leche** | 0,037 – 1,249 | 1,249 - 30,339 | 30,339 - 353,956 | 0,037 - 353,956 |

Para la validación del método analítico se utilizaron los criterios de linealidad, precisión (variaciones inter-día e intra-día), exactitud, límite de detección y cuantificación.

Linealidad

Indica la relación lineal que existe entre los valores de una variable independiente, en este caso las concentraciones patrones de CFQ y la variable de respuesta como es el caso de las áreas cromatográficas.

Se evaluó este criterio tanto para suero como para leche, en el intervalo de concentraciones comprendidos entre 0,037 y 30,34 µg/ml y entre 0,037 y 353,96 µg/ ml para cada matriz, respectivamente.

Los diferentes patrones fueron inyectados en el HPLC seis veces por día, en tres días diferentes.

Se realizó un análisis de regresión lineal sobre un gráfico de coordenadas cartesianas, indicándose este atributo mediante el coeficiente de determinación $r^2$.

Precisión y exactitud

La precisión refleja la proximidad entre las diferentes medidas individuales de una misma concentración. Se describe por el coeficiente de variación:

$$\text{Precisión (\%)} = \frac{\text{desvío estándar}}{\text{media}} \times 100$$

El cálculo se realizó, contemplando los resultados de las áreas cromatográficas, luego de inyectar en el HPLC cada una de las concentraciones de CFQ dieciocho veces en un total de tres días (seis por día), de modo de determinar la variación inter-día o reproducibilidad.

Además se calculó la variación intra-día, o repetibilidad, luego de inyectar cada dilución de CFQ dos veces seguidas, tres veces en el día (con un período de espera, entre dos inyecciones continuas, de aproximadamente cuatro horas).

Se considera que para cada nivel de concentración estos valores no deben ser superiores al 15%, excepto para el límite de cuantificación que puede ser de hasta el 20%.

Por otra parte, la exactitud describe la proximidad de los resultados obtenidos a partir del método analítico respecto del valor verdadero. Surge de la relación entre la concentración experimental de CFQ y la teórica.

$$\text{Exactitud (\%)} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

El denominador de la fórmula es el valor que teóricamente deben tener los estándares luego de su elaboración (ej. 0,037 µg/ml), mientras que la concentración experimental surge de la aplicación de las ecuaciones de la recta de calibrado.

Una exactitud del 100 % es cuando tanto las concentraciones experimentales como las teóricas son iguales, y el valor de este criterio debe encontrarse entre el 80 y 120 % para ser aceptable (VICH / GL2, 1998).

Límite de detección y cuantificación

Las dos expresiones se relacionan con la sensibilidad del método analítico.

El límite de cuantificación se corresponde con la concentración más baja que puede cuantificarse empleando el método validado. Se consideró a este límite teniendo como premisa que debe ser reproducible con una precisión menor o igual de 20 % y una exactitud entre el 80 y 120 %.

Se estableció al límite de detección como la mínima concentración que la técnica es capaz de detectar sin repetir (o con gran variabilidad en la repetición) los resultados.

Recuperación

La recuperación del método extractivo se calculó con las áreas bajo la curva de cinco concentraciones distintas tanto en suero como en leche (20,226 - 10,113 - 6,068 - 0,121 - 0,037 µg/ml), cada una de las cuales fueron inyectadas tres veces en HPLC.

Los porcentajes medios de recuperación y su desvío estándar fueron calculados por comparación de las ABC obtenidas tras la extracción de CFQ a partir del suero (y leche), y las ABC que correspondían a cada concentración de acuerdo a las ecuaciones de las rectas de linealidad de la CFQ en agua.

Estos valores se determinaron sólo para establecer la bondad del método extractivo y no para el cálculo de las concentraciones, ya que las rectas de calibración utilizadas para dicho cálculo fueron confeccionadas en suero y/o leche y, por lo tanto, no fue necesario corregir los resultados con el valor de la recuperación.

### III.2.2.2.- Etapa V: Determinación de la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma en casos de mastitis subclínica caprina por estafilococos coagulasa negativos.

#### III.2.2.2.1.- Aislamientos bacterianos (estafilococos coagulasa negativos)

Se sembró un volumen de 0,01 ml de cada muestra de leche por medio mamario (n = 1302, considerando que se muestrearon 651 animales), en agar base Columbia, suplementada con 5% de sangre de carnero desfibrinada, incubándose 24 a 48 h a 35º C en aerobiosis. Los aislamientos fueron diferenciados del género *Streptococcus* basándose en la morfología de las colonias, tipo de hemólisis y prueba de catalasa. Los estafilococos coagulasa negativos (ECN) fueron identificados tentativamente mediante la prueba de coagulasa en tubo. Se inocularon algunas colonias aisladas en 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (CCC), y se incubaron durante 18 h a 37°C. Posteriormente se colocó en tubo estéril 300 µl del cultivo, al cual se le agregó el mismo volumen de plasma de conejo. Se incubó el tubo en un baño a 37°C, y se observó a las 4 y 24 h la formación de un coágulo. Como control para la prueba de coagulasa se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould 305). Luego de la identificación, los aislamientos fueron conservados a – 80ºC en CCC con glicerol al 10% hasta la realización de las pruebas de susceptibilidad a la CFQ.

#### III.2.2.2.2.- Prueba de susceptibilidad por el método de dilución en agar

El fundamento de este método consiste en evaluar la actividad antimicrobiana (CIM), tras exponer un microorganismo a diferentes concentraciones de un ATM (CFQ en este caso) disueltas en un agar de enriquecimiento.

La CIM se determinó por el método de dilución en agar según normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI/NCCLS, 2002), empleando como cepa control *S. aureus* ATCC 29213.

Para determinar el número de concentraciones a evaluar se tuvieron en cuenta estudios previos para obtener la CIM de CFQ frente a cepas de *S. aureus* aisladas de vacas lecheras con mastitis (Russi *et al*, 2008). Consecuentemente se utilizaron 8 diluciones de CFQ en el intervalo de 0,025 a 3,2 µg/ml. Para elaborarlos se disolvieron 8 mg (corregidos por pureza) del estándar de CFQ sulfato (Intervet International) en 50 ml de agua destilada, realizando las subsiguientes diluciones, tal como lo indica la tabla 16. Como se observa en la misma, son concentraciones diez veces mayores a las requeridas, puesto que se diluyen posteriormente en agar, para obtener la concentración final.

Tabla 16: Elaboración de los estándares de cefquinoma (CFQ).

| Identificación (ID) | Volumen de agua (ml) | ID empleado | Volumen de ID al agua (ml) | Concentración de CFQ (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| **Stock (SS)** | - | - | - | 160,00 |
| **1** | 8 | SS | 2 | 32,00 |
| **2** | 5 | 1 | 5 | 16,00 |
| **3** | 5 | 2 | 5 | 8,00 |
| **4** | 5 | 3 | 5 | 4,00 |
| **5** | 5 | 4 | 5 | 2,00 |
| **6** | 5 | 5 | 5 | 1,00 |
| **7** | 5 | 6 | 5 | 0,50 |
| **8** | 5 | 7 | 5 | 0,25 |

Como medio de cultivo se empleó agar Mueller-Hinton el cual, luego de esterilizado en autoclave (120ºC por 15 minutos), se colocó en baño termostático hasta llegar a una temperatura constante de 47 ºC. Las soluciones de CFQ elaboradas previamente (tabla 16), se vertieron asépticamente en el medio de cultivo en una proporción 1:10 (5 ml de solución de CFQ en 45 ml de agar); se homogeneizó cada erlenmeyer con agar y su respectiva dilución, se midió su pH, y se distribuyó su contenido (por duplicado) en placas de Petri hasta alcanzar un espesor de 4 mm aproximadamente. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 29213 cada vez que se realizó la prueba, para determinar el potencial deterioro del ATM. Además, se prepararon placas sin ATMs como control.

En cuanto al inóculo, se sembraron las cepas de ECN aisladas de la leche, en 5 ml de caldo tripteína de soja. Esta solución se incubó a 35 ºC hasta presentar turbidez, y se ajustó con densitómetro al patrón 0,5 de McFarland. Los cultivos ajustados a este estándar fueron diluidos en proporción 1:10 en caldo tripteína soja para obtener la concentración deseada de $10^7$ UFC/ml.

Luego, en cada placa con agar y su respectiva dilución de CFQ, se colocaron 26 cepas aisladas de ECN (1 µl/cepa) utilizando un multi-inoculador de Steers-Foltz. Se inoculó primero una placa control (sin ATM), luego las que poseían la CFQ (comenzando por la menor concentración), y finalmente otra placa control para asegurarse la ausencia de contaminación o de traspaso de ATM durante el proceso. Las placas, se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos del inóculo fuera absorbida por el agar. Posteriormente se incubaron a 37 ºC durante 18 a 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, las placas se observaron sobre una superficie oscura. Se registró la CIM como la concentración más baja de ATM que inhibió completamente el crecimiento. No se consideraron colonias individuales o la zona borrosa causada por el inóculo.

### III.2.3.- Tratamiento farmacocinético

Una vez obtenidas las concentraciones séricas y en leche para la CFQ en las correspondientes etapas (como se ha descrito en el apartado III.2.1) se construyeron las curvas concentración *versus* tiempos de extracción, y se calcularon los parámetros farmacocinéticos correspondientes.

Para el análisis farmacocinético de las concentraciones de CFQ en suero y en leche frente al tiempo, se utilizó el programa informático PK solution®, versión 2.0. Se utilizó un modelo no compartimental para el análisis de los datos. Este modelo, también llamado modelo independiente, se encuentra libre de todos los supuestos subyacentes sobre el modelo compartimental al cual el fármaco obedece (Farrier, 1997).

La estimación de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo utilizando el modelo de cálculo basado en la estimación del área bajo la curva (ABC), descrito por el perfil concentración – tiempo. En este caso, la estimación del ABC se realiza mediante la aplicación de la regla trapezoidal clásica.

Los parámetros y constantes utilizados para el análisis farmacocinético en suero y leche fueron:

| | |
|---|---|
| Concentración máxima observada | $C_{max}$ |
| Tiempo correspondiente a la $C_{max}$ | $T_{max}$ |

| | | |
|---|---|---|
| Constante de absorción | $\lambda_a$ | $2{,}303 \cdot s$<br>*s: pendiente de la recta en la fase de absorción* |
| Constante de eliminación | $\lambda_e$ | $-2{,}303 \cdot s$<br>*s: pendiente de la recta en la fase de eliminación* |
| Semivida de absorción | $T½\lambda_a$ | $\frac{0{,}693}{\lambda_a}$ |
| Semivida de eliminación | $T½\lambda_e$ | $\frac{0{,}693}{\lambda_e}$ |
| Área bajo la curva calculada al tiempo final observado | $ABC_{0\text{-}t}$ | $\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$<br>*t: tiempo; C: concentración* |
| Área bajo la curva extrapolada a infinito | $ABC\infty$ | $ABC_{0\text{-}t} + \frac{C_n}{\lambda_e}$<br>*$C_n$: concentración final observada* |
| Biodisponibilidad | F | $\frac{ABC_{\text{vía IM}} \cdot Dosis_{\text{vía IV}}}{ABC_{\text{vía IV}} \cdot Dosis_{\text{vía IM}}}$ |
| ABC del primer momento estadístico (C·t *vs* t) | $ABMC\infty$ | $\left[\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i \cdot t_i + C_{i+1} \cdot t_{i+1})\right] + \frac{C_n \cdot t_n}{\lambda_e} + \frac{C_n}{\lambda_e^2}$<br>*$t_n$: tiempo final observado* |
| Tiempo medio de residencia | TMR | $\frac{ABMC\infty}{ABC\infty}$ |
| Tiempo medio de absorción | TMA | $TMR_{\text{vía IM}} - TMR_{\text{vía IV}}$ |
| Volumen aparente de distribución calculado por el método del área | $Vd_{area}$ | $\frac{Dosis}{ABC\infty \cdot \lambda_e}$ |

| | | |
|---|---|---|
| Volumen aparente de distribución en el estado estacionario | $Vd_{ss}$ | $\frac{Dosis \cdot ABMC\infty}{ABC\infty^2}$ |
| Aclaramiento plasmático | Cl | $\frac{Dosis \cdot F}{ABC\infty}$ |

En la etapa IIIb se calcularon los parámetros farmacocinéticos en leche de la primera y última administración IMM, y teniendo en cuenta la dosis total administrada en la glándula mamaria (20 mg ya que por cada medio se administraron 10 mg de CFQ), debido a que el análisis de las concentraciones se realizó a partir de la leche procedente de ambos medios conjuntamente.

### III.2.4.- Tratamiento estadístico. Cálculos de prevalencia y concentración inhibitoria mínima

Todos los parámetros farmacocinéticos de las concentraciones séricas y lácteas obtenidos de cada animal se procesaron y se ajustaron de forma individual y posteriormente, se procedió al cálculo de la media y desvío estándar de los parámetros farmacocinéticos entre los seis individuos que conformaban cada una de las etapas realizadas.

Los parámetros farmacocinéticos de todos los animales, tras cada tratamiento, fueron analizados utilizando el programa estadístico Infostat®, versión 2008.

Los datos fueron procesados mediante un análisis de la varianza (ANOVA), con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni a fin de establecer las posibles diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de cada etapa experimental.

Para la realización de este test, los datos debieron cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Por lo tanto se utilizaron las pruebas de Shapiro Wilks y ANOVA (a los residuos absolutos de los diferentes parámetros) para la normalidad y homocedasticidad, respectivamente.

Cuando los datos no cumplieron con los supuestos anteriores, se empleó la estadística no paramétrica de Kruskall Wallis comparando los datos de manera pareada.

En todos los casos el nivel de significación fue del 5% ($p < 0,05$).

Para la etapa V, se calculó la prevalencia de mastitis subclínica a ECN y la CIM de CFQ frente a estos patógenos.

Un caso de mastitis subclínica fue considerado como tal, cuando una muestra de leche procedente de un medio mamario sin signos clínicos de inflamación presentó aislamiento positivo a ECN. La frecuencia absoluta de casos se tuvo en cuenta para cada medio mamario y para el individuo (cuando al menos uno de los medios resultó positivo). La prevalencia (n° de casos / total de posibles casos en un momento; Thrusfield, 2005) se consideró para los casos por animal.

La CIM fue calculada teniendo en cuenta el número de cepas de ECN inhibidas en las diferentes concentraciones analizadas. A partir de ellas se calculó la proporción de cepas inhibidas y finalmente la frecuencia relativa acumulada de inhibiciones en el 50 y 90 % de las cepas inhibidas ($CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ respectivamente).

### III.2.5.- Integración de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos

Debido a que los β-lactámicos se consideran ATMs tiempo dependientes, se empleó el indicador FC/FD T > CIM, es decir el tiempo en el cual las concentraciones de un ATM se mantienen sobre la CIM (Toutain *et al*, 2002; McKellar *et al*, 2004). Según Toutain *et al* (2002), el parámetro se calcula por observación directa en una gráfica farmacocinética de concentración *versus* tiempo. Para precisar mejor el cálculo, se realizaron interpolaciones por regresión lineal, entre los datos de concentración de las curvas de farmacocinéticas, con las diferentes CIM

En todas las etapas se consideró la $CIM_{90}$ de aquellos patógenos disponibles en la bibliografía para la CFQ, y que pudieran causar diferentes patologías en la especie caprina. De esta forma, se tuvo en cuenta la CIM de CFQ frente a cepas de *Arcanobacterium pyogenes* (Sheldon *et al*, 2004), *Citrobacter* spp (Limbert *et al*, 1991), *Clostridium perfringens* (Thomas *et al*, 2006), *Escherichia coli* (Böttner *et al*, 1995; Deshpande *et al*, 2000; Sheldon *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2006), *Enterobacter* spp (Limbert *et al*, 1991), *Klebsiella pneumoniae* (Deshpande *et al*, 2000), *Mannheimia haemolytica* (Böttner et a, 1995; Wallmann *et al*, 2003; Katsuda *et al*, 2012), *Pasteurella multocida* (Böttner *et al*, 1995; Wallmann *et al*, 2003; Melnikow *et al*, 2008), *Proteus mirabilis* (Limbert *et al*, 1991), *Salmonella* spp (Limbert *et al*, 1991; Böttner *et al*, 1995) *Staphylococcus aureus* y *S. intermedius* (Thomas *et al*; 2006).

En el caso de la etapa IIIb, se consideró el T > CIM de la curva de eliminación en leche luego de la tercera administración IMM y se tuvo en cuenta la $CIM_{90}$, para la CFQ, resultante de los ECN aislados de la leche de las cabras de la región norte de Córdoba (etapa V). También se calculó para esta etapa, el parámetro FC/FD teniendo en cuenta

otros patógenos que pudieran causar mastitis en cabras obtenidos de diferentes fuentes bibliográficas tales como *Streptococcus* spp (Guérin-Faublée *et al*, 2002), *S. aureus* (Russi *et al*, 2008) y *E. coli* (Böttner *et al*, 1995; Deshpande *et al*, 2000; Sheldon *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2004).

# *IV.- RESULTADOS*

# IV.- RESULTADOS

## IV.1.- Metodología analítica

Según las condiciones cromatográficas descriptas en materiales y métodos, en la figura 9 se muestra un cromatograma donde se aprecia la aparición del área bajo la curva de la CFQ en el tiempo de retención de 5,8 minutos y la ausencia de interferencia con otros picos.

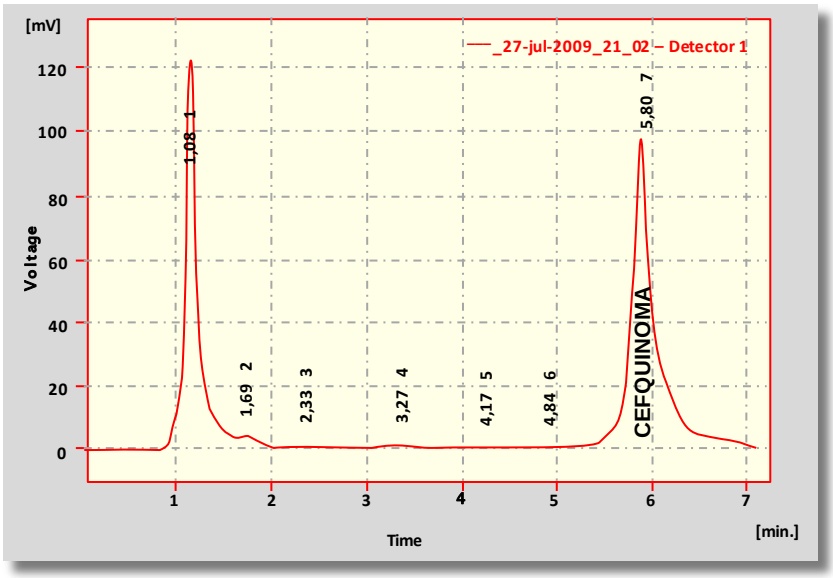



Figura 9: Cromatograma en donde se observa el pico producido por la aparición de cefquinoma a los 5,8 minutos correspondiente al tiempo de retención.

Los resultados de la puesta a punto y validación de la técnica cromatográfica con CFQ en suero y leche caprina, se exponen a continuación en los siguientes apartados.

### IV.1.1.- Rectas de calibración y linealidad

A partir de las soluciones estándares en suero caprino (tabla 15) se construyó una recta de calibrado que permitió establecer la linealidad (figura 10). Las concentraciones que se inyectaron en el HPLC corresponden al intervalo comprendido entre 0,037 y 30,339 µg/ml.

La relación existente entre las distintas concentraciones de CFQ y el área bajo la curva cromatográfica (ABC) resultó lineal en el intervalo de concentraciones ensayadas. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación $r^2$ obtenidos por regresión lineal fueron:

y = 8249,3x + 506,72; donde y = ABC, y x = concentración (µg/ml)

$r^2$ = 0,9971

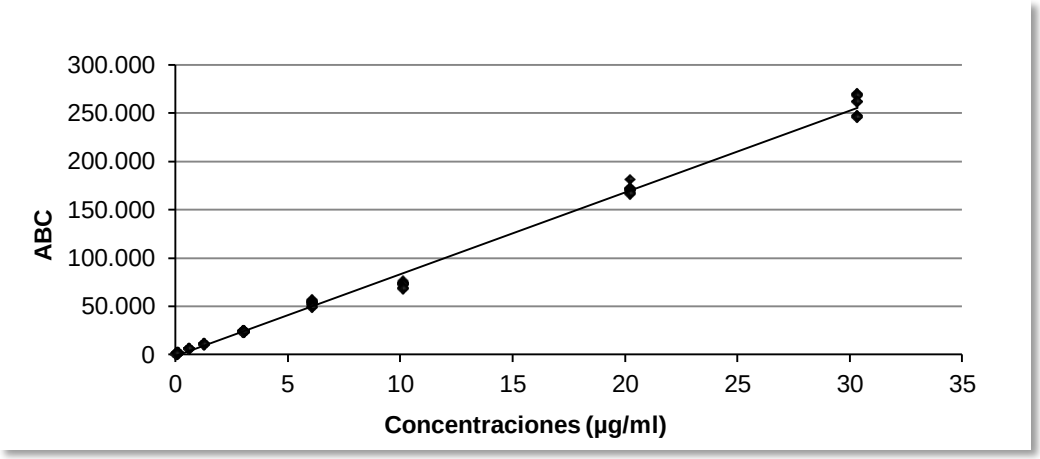



Figura 10: Representación de la recta obtenida mediante regresión lineal de la relación entre las concentraciones de cefquinoma en suero caprino y el área bajo la curva cromatográfica (ABC).

Debido a que el intervalo de concentraciones de los patrones de CFQ en suero fueron amplios, se elaboraron dos rectas de calibrado para las concentraciones comprendidas desde 0,037 a 1,249 y desde 1,249 a 30,339 µg/ml.

El análisis, mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, de los valores del área bajo la curva cromatográfica para las concentraciones de CFQ en suero comprendidas entre 0,037 y 1,249 µg/ml (figura 11), dio lugar a la siguiente ecuación:

y = 8249,3 x + 506,72

$r^2$ = 0,9971

Por otra parte para los valores de concentraciones de CFQ entre 1,249 a 30,339 µg/ml (figura 12), se obtuvo la siguiente ecuación:

y = 8571,4x – 3298

$r^2$ = 0,994

El procedimiento para la construcción de las rectas de calibración y la linealidad de CFQ en leche fue similar que el realizado en suero. Se observa la relación lineal entre las concentraciones de los estándares de CFQ en leche (tabla 15), *versus* las áreas bajo la curva resultantes del cromatógrafo en la figura 13, para el intervalo de concentraciones comprendido entre los 0,037 y 353,956 µg/ml.

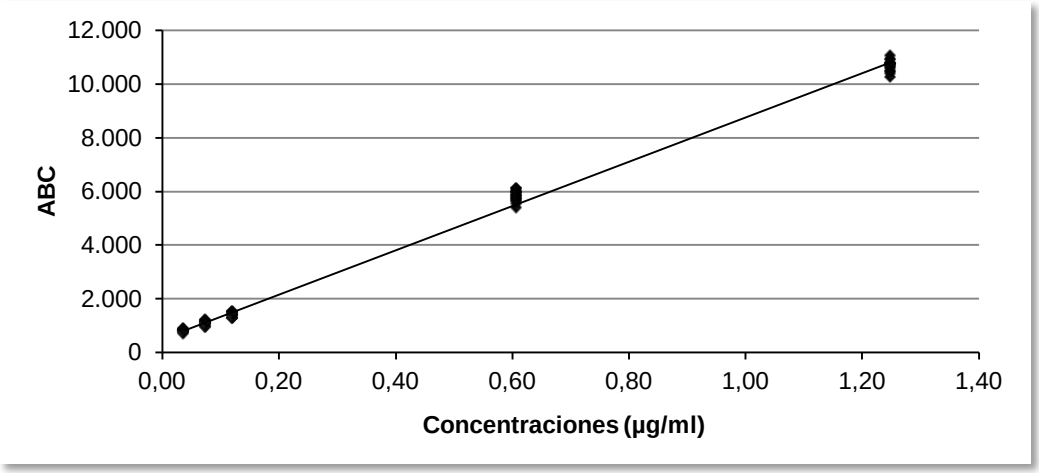



Figura 11: Recta de calibración de cefquinoma en suero para las concentraciones comprendidas entre 0,037 y 1,249 µg/ml

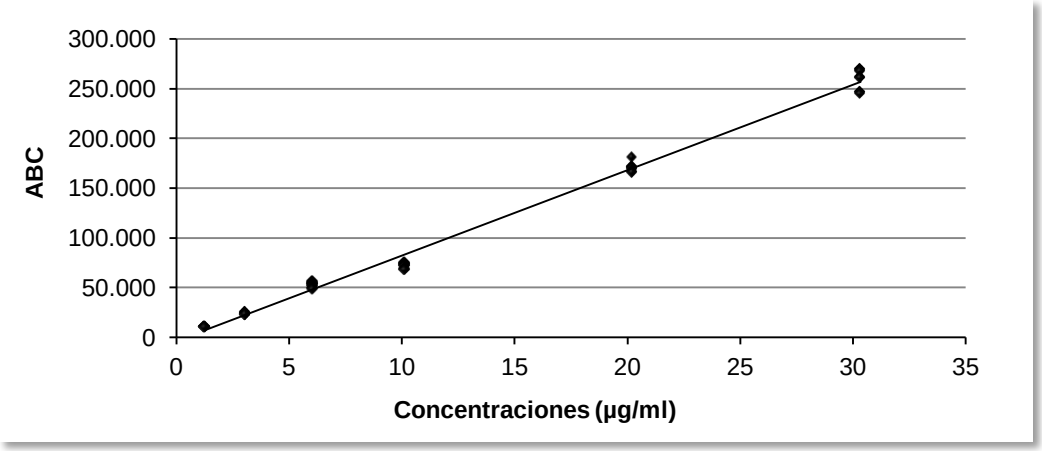



Figura 12: Recta de calibración de cefquinoma en suero para las concentraciones comprendidas entre 1,249 a 30,339 µg/ml.

La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación $r^2$ obtenidos por regresión lineal fueron:

$y = 7946,7x - 6146,8$; donde y = ABC, y x = concentración (µg/ml).

$r^2 = 0,9988$

A su vez, y para evitar los sesgos relacionados con la amplitud del intervalo de concentraciones utilizadas, se constituyeron tres rectas de calibración con concentraciones de CFQ en leche, comprendidas entre los 0,037 a 1,249, 1,249 a 30,339 y 30,339 a 353,956 µg/ml (figuras 14, 16 y 16).

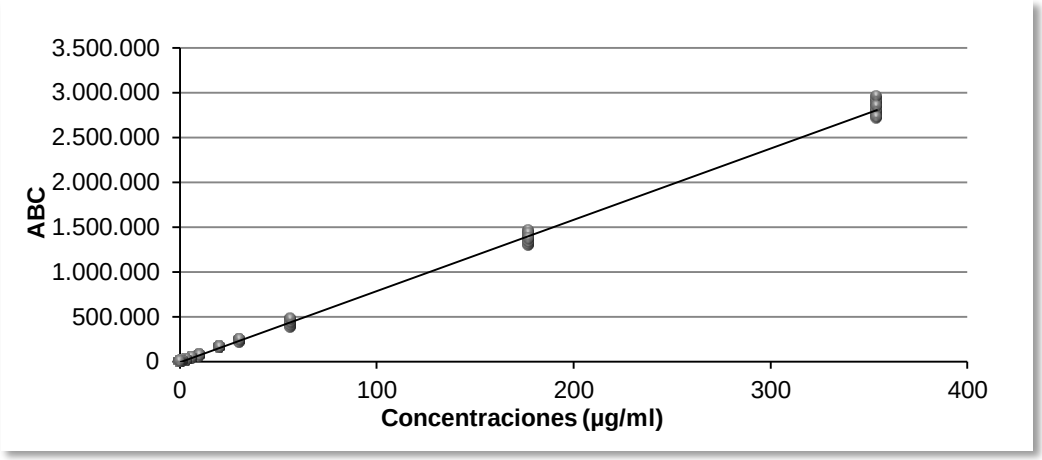



Figura 13: Relación lineal de las concentraciones estándares de cefquinoma en leche caprina con las áreas bajo la curva (ABC) resultantes del cromatógrafo.

Las ecuaciones de cada recta y coeficientes fueron las siguientes:

- Intervalo 0,037 a 1,249 µg/ml:

  $y = 4749,5x + 514,49$

  $r^2 = 0,9928$

- Intervalo 1,249 a 30,339 µg/ml:

  $y = 7818,8x - 5305,9$

  $r^2 = 0,9962$

- Intervalo 30,339 a 353,956 µg/ml:

  $y = 8003x – 20795$

  $r^2 = 0,9979$

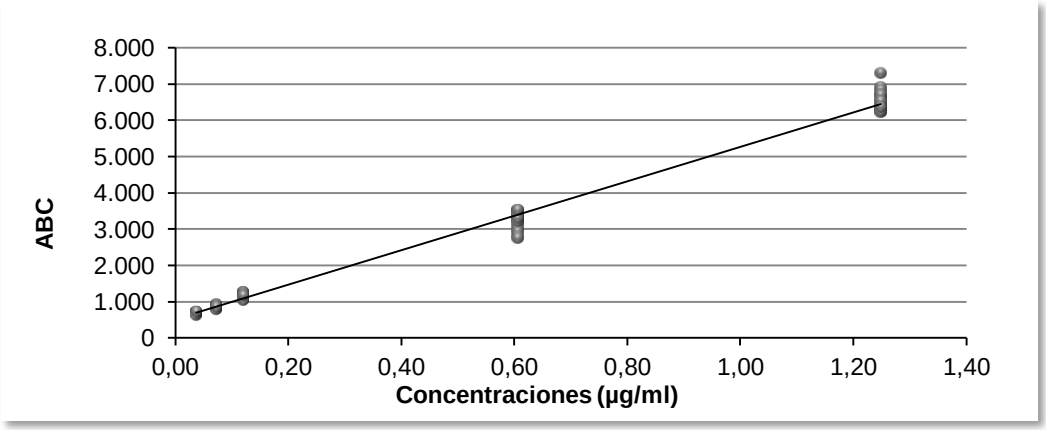



Figura 14: Recta de calibrado de cefquinoma en leche para el intervalo de concentraciones de 0,037 a 1,249 µg/ml

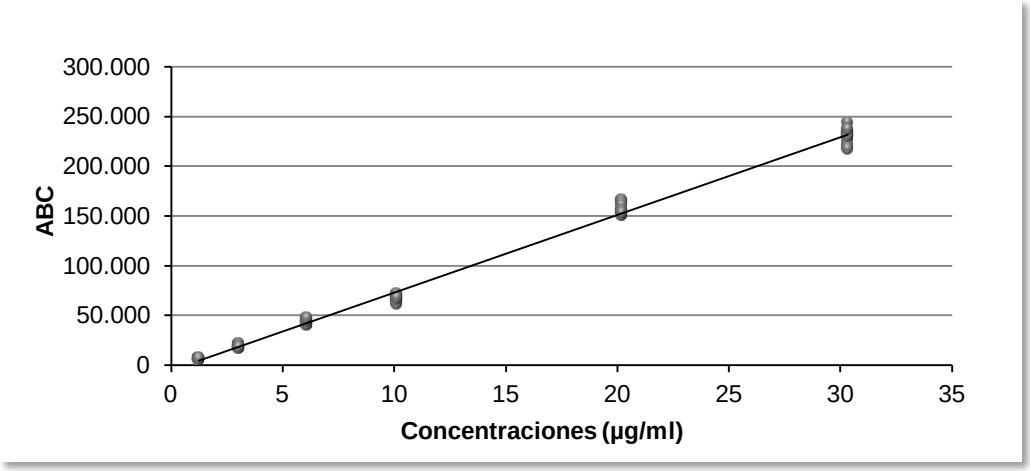



Figura 15: Recta de calibrado de cefquinoma en leche para el intervalo de concentraciones de 1,249 a 30,339 µg/ml.

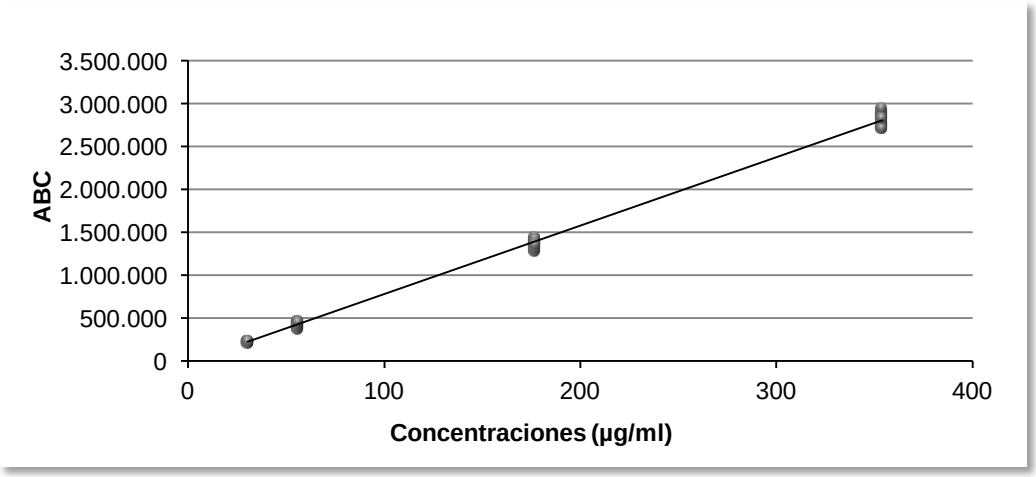



Figura 16: Recta de calibrado de cefquinoma en leche para el intervalo de concentraciones de 30,339 a 353,956 µg/ml.

Los valores de concentraciones y áreas bajo la curva con los que se construyeron todas estas rectas, tanto en suero como en leche, se muestran en la tabla 17.

### IV.1.2.- Precisión y exactitud

La precisión se determinó mediante el cálculo de los coeficientes de variación (C.V.) de las áreas bajo la curva cromatográfica de las diferentes concentraciones.

En las tablas 18 y 19, así como las tablas 56 y 61 del Anexo, se muestran los datos correspondientes a las variaciones intra-día para suero y leche caprina, respectivamente.

La precisión del método, tanto intra como inter-dia, se ve afectada a concentraciones bajas. Se puede observar claramente en la tabla 18 que el mayor coeficiente de variación

intra-día se refleja con 0,037 µg/ml, y a su vez en la concentración de 0,074 µg/ml se registra la mayor variación inter-día. En la tabla 56 del Anexo, se puede observar con mayor detalle este efecto así como, al contrario, los diferentes C.V. mejoran con concentraciones elevadas de CFQ. Independientemente de estas observaciones, en todos los casos (tanto en suero como en leche) los C.V. fueron inferiores a los valores recomendados del 15 %.

Tabla 17: Valores de áreas bajo la curva cromatográfica (ABC) (media ± desvío estándar) tras la inyección de diferentes concentraciones (µg/ml) de cefquinoma disueltas en suero y en leche.

| Concentración (µg/ml) | ABC SUERO (MEDIA ± D.E.) | ABC LECHE (MEDIA ± D.E.) |
|---|---|---|
| 0,037 | 795,89 ± 53,18 | 697,89 ± 27,04 |
| 0,074 | 1.080,39 ± 80,45 | 861,06 ± 34,35 |
| 0,121 | 1.388,83 ± 90,24 | 1.178,22 ± 62,57 |
| 0,607 | 5.815,61 ± 196,75 | 3.235,44 ± 240,87 |
| 1,249 | 10.677,50 ± 200,25 | 6.516,72 ± 283,51 |
| 3,034 | 23.697,83 ± 664,11 | 18.513,06 ± 1.402,30 |
| 6,068 | 52.992,50 ± 2.479,61 | 43.244,33 ± 2.407,15 |
| 10,113 | 72.115,17 ± 2.478,47 | 67.248,28 ±2.986,22 |
| 20,226 | 170.254,89 ± 3.459,72 | 157.041,39 ± 5.258,27 |
| 30,339 | 259.290,44 ± 10.044,40 | 230.963,50 ± 6.424,00 |
| 55,989 | - | 431.255,22 ± 28.745,21 |
| 176,978 | - | 1.372.512,89 ± 46.385,70 |
| 353,956 | - | 2.822.060,06 ± 74.195,95 |

Asimismo, y en lo referente a la exactitud, la técnica también ha cumplimentado con los valores recomendados para este atributo para suero y leche, registrándose cifras no inferiores al 80 %, ni superiores al 120 %. Esto puede verse resumidamente en las tablas 18 y 19, o con mayor detalle en las tablas 58, 59, 63, 64 y 65 del Anexo.

### IV.1.3.- Límites de detección y cuantificación

El límite de cuantificación del método analítico calculado para las concentraciones de CFQ en suero y en leche fue de 0,037 µg/ml, que es el valor más bajo que presenta exactitud (80-120%) y precisión (<10%).

Por otra parte el límite de detección fue de 0,018 µg/ml tanto para suero como para leche caprina.

Tabla 18: Resultados de la validación del método cromatográfico para la cefquinoma en suero caprino.

| Concentración (µg/ml) | Variación intradía C.V. (%) | Variación interdía C.V. (%) | Exactitud (%) |
|---|---|---|---|
| 0,037 | < 8,5 | 6,7 | 80,84 - 118,04 |
| 0,074 | < 8 | 7,5 | 80,17 - 114,06 |
| 0,121 | < 7,5 | 6,5 | 82,00 - 106,75 |
| 0,607 | < 3,5 | 3,4 | 97,54 - 111,88 |
| 1,249 | < 2 | 1,9 | 94,53 - 102,25 |
| 3,034 | < 1 | 2,8 | 101,12 - 107,97 |
| 6,068 | < 3,5 | 4,7 | 98,94 - 115,05 |
| 10,113 | ≤ 2 | 3,4 | 81,96 - 91,38 |
| 20,226 | < 4 | 2,0 | 97,42 - 106,38 |
| 30,339 | ≤ 1 | 3,9 | 95,42 - 105,05 |

Los coeficientes de variación (C.V.) intra e inter-día, y el intervalo para el cálculo de la exactitud, se tuvieron en cuenta con un n = 18 correspondientes a las inyecciones en el cromatógrafo, por cada concentración (se amplía la información en las tablas del Anexo).

Tabla 19: Resultados de la validación del método cromatográfico para la cefquinoma en leche caprina.

| Concentración (µg/ml) | Variación intradía C.V. (%) | Variación interdía C.V. (%) | Exactitud (%) |
|---|---|---|---|
| 0,037 | < 6 | 3,9 | 80,53 - 119,79 |
| 0,074 | < 4 | 4,0 | 80,10 - 119,72 |
| 0,121 | < 6 | 5,3 | 91,96 - 120,00 |
| 0,607 | < 9,5 | 7,4 | 80,07 - 103,84 |
| 1,249 | < 6,5 | 4,4 | 96,05 - 114,01 |
| 3,034 | < 8,5 | 7,6 | 94,54 - 113,87 |
| 6,068 | < 7 | 5,6 | 96,23 - 110,43 |
| 10,113 | < 5,5 | 4,4 | 84,28 - 97,70 |
| 20,226 | < 3,5 | 3,4 | 98,27 - 108,03 |
| 30,339 | < 3,5 | 2,8 | 93,88 - 105,00 |
| 55,989 | < 8,5 | 6,7 | 89,21 - 110,13 |
| 176,978 | < 4 | 3,4 | 92,64 - 104,33 |
| 353,956 | < 3 | 2,6 | 96,60 - 104,96 |

Los coeficientes de variación (C.V.) intra e inter-día, y el intervalo para el cálculo de la exactitud, se tuvieron en cuenta con un n = 18 correspondientes a las inyecciones en el cromatógrafo, por cada concentración (se amplía la información en las tablas del Anexo).

### IV.1.4.- Recuperación

El porcentaje de recuperación en suero para las concentraciones inyectadas en el HPLC (n =3) de 0,037; 6,068 y 20,226 µg/ml estuvieron comprendidas en el intervalo del 90 al 100 %, mientras que las concentraciones de 0,121 y 10,113 µg/ml lo estuvieron en general alrededor del 85 %.

En tanto que para la leche la recuperación fue un tanto inferior con valores del 85 al 95 % para las concentraciones de 0,037 y 20,226 µg/ml, y alrededor del 70 % para las

concentraciones restantes (0,121; 6,068 y 10,113 µg/ml). En las tablas 60 y 66 del Anexo, se detallan dichos resultados.

## IV.2.- Análisis farmacocinético

### IV.2.1.- Etapa I: farmacocinética en cabras adultas no lactantes ni gestantes

Ninguna reacción inflamatoria o cuadro clínico compatible con dolor se observó tras la administración de la CFQ por cualquiera de las diferentes vías utilizadas en ésta y en las sucesivas etapas de prueba.

En la figura 17 se observa la curva de disposición sérica de CFQ tras la administración IV a lo largo del tiempo. Las concentraciones (medias ± D.E.) se han mantenido con poca variación en todos los tiempos de muestreo para los seis animales.

Luego de 8 h de la administración, la concentración media en suero de CFQ se redujo de 11,27 ± 0,53 a 0,06 ± 0,02 µg/ml. En sólo dos animales (C y D) se registraron concentraciones por encima del límite de cuantificación hasta las 10 h. Los datos de concentración (µg/ml) en suero por animal a cada tiempo, se pueden ver en la tabla 20.

Luego del análisis farmacocinético de los datos, tras un modelo no compartimental, se obtuvieron los diferentes parámetros, que se resumen en la tabla 21.

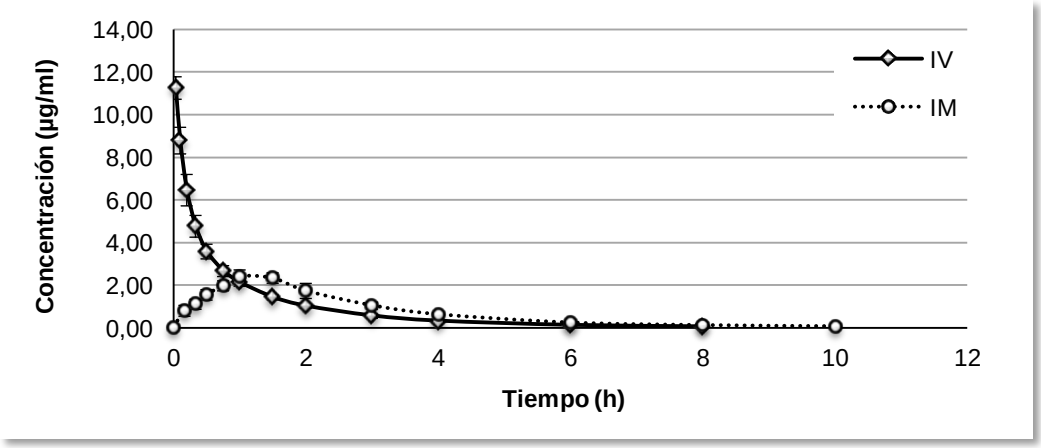



Figura 17: Evolución de las concentraciones séricas de cefquinoma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg intravenosa (IV) e intramuscular (IM) en cabras adultas, no lactantes ni preñadas (n = 6), expresadas como media ± D.E.

Por su parte, en las mismas cabras y mediante un diseño cruzado, se administraron 2 mg/kg de CFQ por la vía IM. En la figura 17 y tabla 22 se resumen los datos de concentración sérica de CFQ, a cada tiempo de extracción.

La tabla 23 aporta información de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en esta etapa por la vía IM.

Tabla 20: Concentraciones séricas por animal de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican, en horas, luego de la administración de 2 mg/kg del antimicrobiano vía IV

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | H | W | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 10,916 | 12,070 | 11,575 | 11,468 | 10,654 | 10,938 | 11,270 ± 0,527 |
| 0,10 | 8,933 | 9,954 | 8,818 | 8,383 | 8,206 | 8,521 | 8,802 ± 0,625 |
| 0,20 | 6,632 | 7,805 | 5,787 | 6,423 | 6,422 | 5,805 | 6,479 ± 0,738 |
| 0,33 | 4,713 | 5,535 | 4,502 | 4,950 | 4,989 | 4,022 | 4,785 ± 0,509 |
| 0,50 | 3,267 | 4,066 | 3,535 | 3,909 | 3,631 | 3,193 | 3,600 ± 0,345 |
| 0,75 | 2,346 | 2,965 | 2,663 | 2,944 | 2,746 | 2,438 | 2,684 ± 0,255 |
| 1,00 | 1,989 | 2,391 | 2,102 | 2,297 | 2,121 | 1,959 | 2,143 ± 0,170 |
| 1,50 | 1,461 | 1,627 | 1,482 | 1,435 | 1,377 | 1,286 | 1,445 ± 0,114 |
| 2,00 | 1,099 | 1,173 | 0,996 | 0,984 | 0,959 | 0,970 | 1,030 ± 0,086 |
| 3,00 | 0,692 | 0,705 | 0,513 | 0,484 | 0,506 | 0,528 | 0,571 ± 0,100 |
| 4,00 | 0,387 | 0,374 | 0,297 | 0,311 | 0,303 | 0,293 | 0,328 ± 0,042 |
| 6,00 | 0,124 | 0,142 | 0,127 | 0,158 | 0,105 | 0,110 | 0,128 ± 0,020 |
| 8,00 | 0,056 | 0,056 | 0,071 | 0,096 | 0,040 | 0,037 | 0,059 ± 0,022 |
| 10,00 | ND | ND | 0,042 | 0,055 | ND | ND | - |
| 12,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado.

Tabla 21: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en cabras.

| Parámetro | Unidad | A | B | C | D | H | W | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,51 | 0,50 | 0,35 | 0,30 | 0,51 | 0,54 | 0,45 ± 0,10 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,36 | 1,39 | 1,96 | 2,28 | 1,36 | 1,29 | 1,61 ± 0,41 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 10,92 | 12,07 | 11,58 | 11,47 | 10,65 | 10,94 | 11,27 ± 0,53 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 7,92 | 8,96 | 7,74 | 8,14 | 7,57 | 7,14 | 7,91 ± 0,61 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 8,02 | 9,07 | 7,86 | 8,33 | 7,65 | 7,21 | 8,02 ± 0,63 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 12,18 | 13,06 | 12,62 | 14,59 | 10,34 | 10,02 | 12,13 ± 1,72 |
| TMR | h | 1,52 | 1,44 | 1,61 | 1,75 | 1,35 | 1,39 | 1,51 ± 0,15 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 489,30 | 441,32 | 718,70 | 791,09 | 512,47 | 517,41 | 578,38 ± 141,22 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 378,29 | 317,37 | 409,04 | 420,80 | 353,38 | 385,20 | 377,35 ± 37,75 |
| Cl | ml·kg/h | 249,22 | 220,50 | 254,56 | 240,17 | 261,50 | 277,29 | 250,54 ± 19,31 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 22: Concentraciones séricas por animal de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican, en horas, luego de la administración de 2 mg/kg del antimicrobiano vía IM.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | H | W | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,17 | 0,634 | 0,485 | 1,028 | 1,020 | 0,677 | 1,095 | 0,823 ± 0,255 |
| 0,33 | 1,035 | 0,765 | 1,309 | 1,317 | 0,995 | 1,345 | 1,128 ± 0,234 |
| 0,50 | 1,360 | 1,609 | 1,878 | 1,748 | 1,216 | 1,601 | 1,569 ± 0,244 |
| 0,75 | 1,834 | 2,388 | 2,067 | 1,912 | 1,715 | 2,032 | 1,991 ± 0,233 |
| 1,00 | 2,378 | 2,798 | 2,719 | 2,078 | 2,092 | 2,518 | 2,431 ± 0,306 |
| 1,50 | 2,174 | 2,690 | 2,022 | 2,417 | 2,534 | 2,292 | 2,355 ± 0,243 |
| 2,00 | 1,870 | 2,229 | 1,208 | 1,857 | 1,864 | 1,500 | 1,755 ± 0,353 |
| 3,00 | 1,018 | 1,326 | 1,018 | 1,117 | 1,078 | 0,824 | 1,064 ± 0,163 |
| 4,00 | 0,645 | 0,699 | 0,631 | 0,639 | 0,738 | 0,466 | 0,637 ± 0,093 |
| 6,00 | 0,327 | 0,205 | 0,233 | 0,331 | 0,194 | 0,170 | 0,243 ± 0,069 |
| 8,00 | 0,134 | 0,100 | 0,159 | 0,171 | 0,063 | 0,102 | 0,122 ± 0,041 |
| 10,00 | 0,063 | 0,057 | 0,090 | 0,088 | 0,039 | 0,064 | 0,067 ± 0,019 |
| 12,00 | LOQ | LOQ | 0,040 | ND | ND | ND | |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 23: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IM, en cabras.

| Parámetro | Unidad | A | B | C | D | H | W | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_a$ | $h^{-1}$ | 1,76 | 2,34 | 3,87 | 1,65 | 1,54 | 1,94 | 2,18 ± 0,87 |
| $T½\lambda_a$ | h | 0,39 | 0,30 | 0,18 | 0,42 | 0,45 | 0,36 | 0,35 ± 0,10 |
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,40 | 0,45 | 0,34 | 0,35 | 0,50 | 0,36 | 0,40 ± 0,06 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,75 | 1,53 | 2,03 | 1,96 | 1,38 | 1,91 | 1,76 ± 0,26 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 2,38 | 2,80 | 2,72 | 2,42 | 2,53 | 2,52 | 2,56 ± 0,17 |
| $T_{max}$ | h | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,50 | 1,50 | 1,00 | 1,17 ± 0,26 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 7,37 | 8,25 | 7,20 | 7,78 | 7,15 | 6,60 | 7,39 ± 0,57 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 7,53 | 8,37 | 7,32 | 8,03 | 7,23 | 6,77 | 7,54 ± 0,58 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 21,50 | 21,43 | 21,26 | 23,97 | 18,33 | 17,38 | 20,65 ± 2,40 |
| TMA | h | 1,34 | 1,12 | 1,30 | 1,23 | 1,19 | 1,18 | 1,23 ± 0,08 |
| TMR | h | 2,85 | 2,56 | 2,90 | 2,99 | 2,54 | 2,57 | 2,73 ± 0,20 |
| F | % | 93,85 | 92,33 | 93,19 | 96,39 | 94,50 | 93,87 | 94,02 ± 1,37 |

$\lambda_a$: constante de absorción; $T½\lambda_a$: semivida de absorción; $\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $T_{max}$: tiempo correspondiente a la concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMA: tiempo medio de absorción; TMR: tiempo medio de residencia; F: biodisponibilidad.

### IV.2.2.- Etapa II: cefquinoma en cabras gestantes

#### IV.2.2.1.- Etapa IIa: Farmacocinética por vía IV e IM

Luego de la administración de 2 mg/kg de CFQ por las vías IV e IM a seis cabras en gestación, en un diseño cruzado, se obtuvieron las curvas farmacocinéticas que se representan en la figura 18 y cuyas concentraciones séricas, para cada vía y tiempo de muestreo, se observan en las tablas 24 y 26.

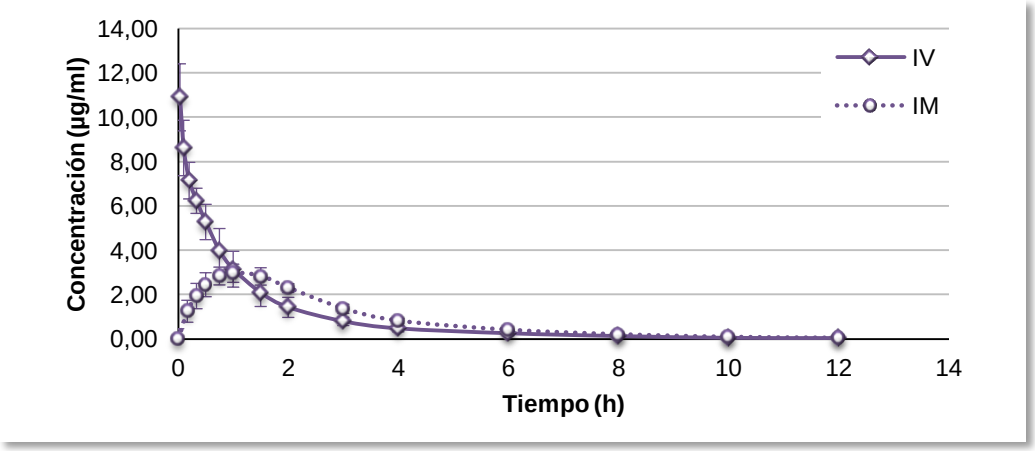



Figura 18: Curva concentración – tiempo de cefquinoma tras la administración de 2 mg/kg por las vías intravenosa (IV) e intramuscular (IM) a seis cabras en gestación.

Tabla 24: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabras en gestación.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | G | J | K | L | M | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 12,775 | 12,231 | 11,761 | 9,540 | 9,536 | 9,607 | 10,908 ± 1,511 |
| 0,10 | 10,066 | 8,271 | 10,317 | 7,850 | 7,371 | 7,876 | 8,625 ± 1,249 |
| 0,20 | 8,121 | 7,069 | 8,177 | 6,537 | 6,195 | 6,811 | 7,152 ± 0,825 |
| 0,33 | 6,903 | 6,174 | 6,914 | 5,649 | 5,645 | 6,178 | 6,244 ± 0,567 |
| 0,50 | 5,973 | 5,550 | 6,314 | 4,224 | 4,968 | 4,701 | 5,288 ± 0,796 |
| 0,75 | 4,845 | 3,633 | 5,402 | 2,830 | 4,141 | 3,098 | 3,992 ± 1,002 |
| 1,00 | 3,975 | 3,209 | 4,061 | 2,024 | 3,219 | 2,472 | 3,160 ± 0,806 |
| 1,50 | 2,263 | 2,134 | 2,805 | 1,081 | 2,543 | 1,738 | 2,094 ± 0,615 |
| 2,00 | 1,190 | 1,544 | 1,949 | 0,783 | 1,913 | 1,253 | 1,439 ± 0,452 |
| 3,00 | 0,825 | 0,824 | 0,779 | 0,472 | 1,031 | 0,910 | 0,807 ± 0,187 |
| 4,00 | 0,700 | 0,589 | 0,409 | 0,269 | 0,525 | 0,422 | 0,486 ± 0,152 |
| 6,00 | 0,301 | 0,313 | 0,200 | 0,098 | 0,394 | 0,288 | 0,265 ± 0,103 |
| 8,00 | 0,083 | 0,162 | 0,113 | 0,085 | 0,261 | 0,129 | 0,139 ± 0,067 |
| 10,00 | 0,079 | 0,073 | 0,034 | 0,072 | 0,053 | 0,045 | 0,059 ± 0,018 |
| 12,00 | 0,046 | ND | ND | 0,066 | 0,039 | ND | 0,051 ± 0,014 |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado.

Tras el análisis farmacocinético por un modelo no compartimental, se obtuvieron los parámetros para las vías IV e IM, que se muestran en las tablas 25 y 27.

Tabla 25: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabras en gestación.

| Parámetro | Unidad | F | G | J | K | L | M | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,34 | 0,36 | 0,45 | 0,30 | 0,38 | 0,41 | 0,37 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 2,01 | 1,92 | 1,54 | 2,28 | 1,83 | 1,70 | 1,88 ± 0,26 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 12,78 | 12,23 | 11,76 | 9,54 | 9,54 | 9,61 | 11,06 ± 1,37 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 12,47 | 11,44 | 12,77 | 7,83 | 12,05 | 9,94 | 11,09 ± 1,88 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 12,61 | 11,65 | 12,81 | 8,05 | 12,16 | 10,05 | 11,22 ± 1,84 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 22,92 | 22,60 | 19,23 | 15,35 | 25,96 | 18,34 | 20,73 ± 3,81 |
| TMR | h | 1,82 | 1,94 | 1,50 | 1,91 | 2,14 | 1,82 | 1,85 ± 0,21 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 461,18 | 475,28 | 345,96 | 817,11 | 434,44 | 488,63 | 503,77 ± 161,71 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 288,47 | 333,25 | 234,41 | 474,15 | 351,33 | 363,02 | 340,77 ± 80,62 |
| Cl | ml·kg/h | 158,66 | 171,74 | 156,16 | 248,54 | 164,52 | 198,99 | 183,10 ± 35,59 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 26: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IM a seis cabras en gestación.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | G | J | K | L | M | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,17 | 0,987 | 1,052 | 2,070 | 1,038 | 1,607 | 0,837 | 1,265 ± 0,474 |
| 0,33 | 1,504 | 2,141 | 2,583 | 1,361 | 2,384 | 1,724 | 1,949 ± 0,494 |
| 0,50 | 2,198 | 2,772 | 3,044 | 1,638 | 3,019 | 2,090 | 2,460 ± 0,571 |
| 0,75 | 2,631 | 3,044 | 3,547 | 2,029 | 3,247 | 2,614 | 2,852 ± 0,540 |
| 1,00 | 2,805 | 2,944 | 3,468 | 2,359 | 3,376 | 2,920 | 2,979 ± 0,404 |
| 1,50 | 2,964 | 2,614 | 3,304 | 2,258 | 3,255 | 2,615 | 2,835 ± 0,411 |
| 2,00 | 2,587 | 2,077 | 2,833 | 1,805 | 2,483 | 2,047 | 2,305 ± 0,390 |
| 3,00 | 1,443 | 1,484 | 1,530 | 1,050 | 1,539 | 1,225 | 1,379 ± 0,198 |
| 4,00 | 0,773 | 1,048 | 0,879 | 0,484 | 1,015 | 0,764 | 0,827 ± 0,206 |
| 6,00 | 0,417 | 0,553 | 0,360 | 0,275 | 0,496 | 0,426 | 0,421 ± 0,098 |
| 8,00 | 0,258 | 0,229 | 0,188 | 0,156 | 0,257 | 0,226 | 0,219 ± 0,040 |
| 10,00 | 0,154 | 0,102 | 0,079 | 0,092 | 0,097 | 0,090 | 0,102 ± 0,027 |
| 12,00 | 0,098 | 0,046 | 0,051 | 0,069 | 0,059 | 0,046 | 0,061 ± 0,020 |
| 24,00 | LOQ | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 27: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IM, en seis cabras en gestación.

| Parámetro | Unidad | F | G | J | K | L | M | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_a$ | $h^{-1}$ | 1,74 | 1,78 | 1,98 | 2,14 | 2,23 | 2,30 | 2,03 ± 0,23 |
| $T½\lambda_a$ | h | 0,40 | 0,39 | 0,35 | 0,32 | 0,31 | 0,30 | 0,35 ± 0,04 |
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,26 | 0,40 | 0,36 | 0,29 | 0,37 | 0,36 | 0,34 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 2,71 | 1,74 | 1,92 | 2,39 | 1,89 | 1,93 | 2,10 ± 0,37 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 2,96 | 3,04 | 3,55 | 2,36 | 3,38 | 2,92 | 3,04 ± 0,41 |
| $T_{max}$ | h | 1,50 | 0,75 | 0,75 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 ± 0,27 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 10,37 | 10,71 | 11,53 | 7,51 | 11,68 | 9,35 | 10,19 ± 1,56 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 10,75 | 10,83 | 11,67 | 7,74 | 11,84 | 9,48 | 10,39 ± 1,54 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 36,48 | 32,49 | 30,69 | 24,12 | 34,31 | 28,16 | 31,04 ± 4,44 |
| TMA | h | 1,58 | 1,06 | 1,13 | 1,21 | 0,76 | 1,15 | 1,15 ± 0,26 |
| TMR | h | 3,39 | 3,00 | 2,63 | 3,12 | 2,90 | 2,97 | 3,00 ± 0,25 |
| F | % | 85,28 | 92,96 | 91,12 | 96,24 | 97,42 | 94,33 | 92,89 ± 4,35 |

λa: constante de absorción; T½λa: semivida de absorción; λe: constante de eliminación; T½λe: semivida de eliminación; Cmax: concentración máxima; Tmax: tiempo correspondiente a la concentración máxima; ABC0-t: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMA: tiempo medio de absorción; TMR: tiempo medio de residencia; F: biodisponibilidad.

### IV.2.2.2.- Etapa IIb: Paso a través de la placenta

Para evaluar el paso de CFQ por la placenta, se procedió a realizar una cesárea a seis cabras al momento del parto.

Respetando el protocolo de muestreo propuesto en materiales y métodos se obtuvieron las diferentes muestras a los tiempos señalados en la tabla 28 y las concentraciones de cada tipo de muestra en la tabla 29.

Tabla 28: Tiempos de muestreo por animal de las diferentes muestras extraídas luego de administrar cefquinoma en cabras al momento del parto a la dosis de 2 mg/kg IV.

| | Tiempo de muestreo (minutos) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Muestra** | **O** | **I** | **N** | **R** | **S** | **X** | **MEDIA ± D.E.** |
| Sangre materna | 15 | 30 | 44 | 40 | 45 | 22 | 33 ± 12 |
| Líquido amniótico | 20 | 37 | 50 | 54 | 54 | 30 | 41 ± 14 |
| Sangre fetal | 22 | 39 | 51 | 56 | 56 | 34 | 43 ± 14 |
| Cotiledón | 25 | 40 | 52 | 57 | 65 | 32 | 45 ± 15 |

Tabla 29: Concentraciones de cefquinoma por animal en las diferentes muestras extraídas luego de la administración del antimicrobiano en cabras al momento del parto (2 mg/kg IV)

| | Concentración (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Muestra** | **O** | **I** | **N** | **R** | **S** | **X** | **MEDIA ± D.E.** |
| **Suero madre pre-administración cefquinoma** | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| **Suero madre post-administración cefquinoma** | 7,401 | 6,163 | 4,408 | 3,296 | 2,817 | 7,121 | 5,201 ± 1,969 |
| **Liquido amniótico** | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| **Suero fetal (sangre venosa)** | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| **Cotiledón** | 0,165 | 0,138 | 0,191 | 0,138 | LOQ | 0,236 | 0,174 ± 0,041 |

ND: no detectado. LOQ: debajo del límite de cuantificación.

### IV.2.3.- Etapa III: cefquinoma en cabras lactantes

En esta etapa se procedió a administrar la CFQ a cabras en período de lactación. Se destaca que se realizó un diseño cruzado sólo para las vías IV e IM (3 animales por vía por ensayo) y no para la vía IMM (razón por la cual se la trata como una sub-etapa). Las tablas 30, 31 y 32 presentan los datos de volumen producido, correspondientes a cada tiempo de muestreo, del cual se obtuvo una alícuota (luego de ser homogeneizada) para evaluar la concentración de CFQ tras la administración IV, IM o IMM, según corresponda. En dichas tablas se observan las variaciones de producción (representadas en forma proporcional con barras grises). Cabe recordar que para la farmacocinética intramamaria se tomaron muestras intermedias (cada dos horas luego de la administración), de sólo 40 ml.

Tabla 30: Producción láctea (media ± desvío estándar corregida cada 12 h) correspondiente a cada uno de los animales en la farmacocinética de cefquinoma por vía intravenosa.

| **Tiempo (h)** | Volumen de leche (ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **E** | **Q** | **R** | **T** | **U** | **Z** |
| 0 | 900 | 1700 | 900 | 1250 | 1850 | 1350 |
| 2 | 150 | 200 | 150 | 300 | 300 | 250 |
| 4 | 150 | 100 | 100 | 50 | 100 | 50 |
| 6 | 350 | 100 | 200 | 250 | 200 | 150 |
| 8 | 100 | 150 | 150 | 200 | 120 | 150 |
| 10 | 250 | 30 | 100 | 200 | 300 | 200 |
| 12 | 100 | 100 | 250 | 150 | 100 | 100 |
| 24 | 750 | 750 | 800 | 750 | 1100 | 850 |
| 36 | 1100 | 850 | 675 | 1000 | 1000 | 750 |
| 48 | 1000 | 850 | 800 | 900 | 1200 | 800 |
| MEDIA / 12 h | 970,00 | 966,00 | 825,00 | 1010,00 | 1254,00 | 930,00 |
| D.E. / 12 h | 148,32 | 416,57 | 106,07 | 198,12 | 340,71 | 241,35 |

Tabla 31: Producción láctea (media ± desvío estándar corregida cada 12 h) correspondiente a cada uno de los animales en la farmacocinética de cefquinoma por vía intramuscular.

| Tiempo (h) | Volumen de leche (ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| 0 | 1000 | 850 | 1000 | 1700 | 1200 | 1200 |
| 2 | 500 | 150 | 150 | 100 | 150 | 100 |
| 4 | 70 | 50 | 200 | 50 | 150 | 50 |
| 6 | 120 | 200 | 120 | 100 | 250 | 200 |
| 8 | 120 | 100 | 160 | 300 | 200 | 100 |
| 10 | 170 | 100 | 100 | 300 | 150 | 100 |
| 12 | 100 | 90 | 180 | 200 | 170 | 200 |
| 24 | 1000 | 350 | 750 | 750 | 1200 | 800 |
| 36 | 750 | 750 | 750 | 1100 | 1000 | 1000 |
| 48 | 1000 | 1000 | 750 | 700 | 900 | 850 |
| MEDIA / 12 h | 966,00 | 728,00 | 832,00 | 1060,00 | 1074,00 | 920,00 |
| D.E. / 12 h | 125,62 | 241,70 | 116,70 | 399,06 | 129,92 | 182,35 |

Tabla 32: Producción láctea correspondiente a cada uno de los animales en la farmacocinética de cefquinoma por vía intramamaria.

| Tiempo (h) | Volumen de leche (ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| 0 | 1200 | 1400 | 800 | 400 | 1000 | 500 |
| 12 | 200 | 150 | 130 | 250 | 100 | 150 |
| 24 | 80 | 400 | 300 | 300 | 300 | 80 |
| 36 | 150 | 300 | 200 | 180 | 200 | 50 |
| 48 | 300 | 700 | 300 | 200 | 350 | 200 |
| 60 | 200 | 500 | 300 | 100 | 300 | 100 |
| 72 | 300 | 600 | 300 | 180 | 350 | 200 |
| 84 | 180 | 530 | 220 | 140 | 300 | 120 |
| 96 | 400 | 700 | 380 | 180 | 500 | 220 |
| 108 | 200 | 400 | 220 | 200 | 230 | 150 |
| 120 | 200 | 400 | 210 | 180 | 350 | 150 |
| 132 | 180 | 200 | 200 | 120 | 210 | 200 |
| 144 | 270 | 700 | 350 | 150 | 400 | 200 |
| MEDIA | 296,92 | 536,92 | 300,77 | 198,46 | 353,08 | 178,46 |
| D.E. | 282,91 | 316,97 | 165,50 | 79,88 | 218,68 | 109,99 |

Los valores de pH se observan en las tablas 33, 34 y 35 para las diferentes administraciones.

No se aislaron microorganismos de ninguna muestra de leche.

En los apartados subsiguientes se informan los resultados de las concentraciones de CFQ en leche y suero, por las diferentes vías.

Tabla 33: Datos de pH de la leche en cada animal y tiempo de muestreo para la vía intravenosa

| Tiempo (h) | pH leche | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| 0 | 6,73 | 6,60 | 6,66 | 6,91 | 6,70 | 6,72 |
| 24 | 6,64 | 6,71 | 6,79 | 6,80 | 6,57 | 6,66 |
| 48 | 6,65 | 6,65 | 6,71 | 6,63 | 6,59 | 6,55 |
| MEDIA | 6,67 | 6,65 | 6,72 | 6,78 | 6,62 | 6,64 |
| D.E. | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,14 | 0,07 | 0,09 |

Tabla 34: Datos de pH de la leche en cada animal y tiempo de muestreo para la vía intramuscular

| Tiempo (h) | pH leche | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| 0 | 6,85 | 6,83 | 6,77 | 6,55 | 6,7 | 6,64 |
| 24 | 6,58 | 6,85 | 6,7 | 6,74 | 6,6 | 6,61 |
| 48 | 6,54 | 6,73 | 6,64 | 6,63 | 6,5 | 6,55 |
| MEDIA | 6,66 | 6,80 | 6,70 | 6,64 | 6,60 | 6,60 |
| D.E. | 0,17 | 0,06 | 0,07 | 0,10 | 0,10 | 0,05 |

Tabla 35: Datos de pH de la leche en cada animal y tiempo de muestreo para la vía intramamaria

| Tiempo (h) | pH leche | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| 0 | 6,36 | 6,57 | 6,50 | 6,77 | 6,82 | 6,58 |
| 2 | 6,83 | 6,85 | 6,59 | 7,05 | 7,36 | 6,67 |
| 4 | 6,90 | 6,75 | 6,50 | 7,05 | 7,40 | 6,70 |
| 6 | 6,83 | 6,67 | 6,45 | 6,96 | 6,30 | 6,72 |
| 8 | 6,99 | 6,64 | 6,40 | 6,90 | 6,83 | 6,64 |
| 10 | 7,03 | 6,70 | 6,39 | 6,87 | 6,70 | 6,50 |
| 12 | 6,73 | 6,49 | 6,47 | 6,60 | 6,50 | 6,52 |
| 14 | 6,69 | 6,50 | 6,40 | 6,96 | 6,50 | 6,51 |
| 24 | 6,82 | 6,35 | 6,32 | 6,64 | 6,58 | 6,47 |
| 26 | 6,81 | 6,42 | 6,30 | 6,97 | 6,68 | 6,54 |
| 28 | 6,67 | 6,29 | 6,33 | 6,70 | 6,61 | 6,45 |
| 30 | 6,75 | 6,13 | 6,01 | 6,81 | 6,53 | 6,45 |
| 32 | 6,74 | 6,42 | 6,40 | 6,95 | 6,64 | 6,44 |
| 34 | 6,80 | 6,50 | 6,42 | 6,87 | 6,53 | 6,51 |
| 36 | 6,90 | 6,60 | 6,50 | 6,60 | 6,78 | 6,59 |
| 48 | 6,64 | 6,43 | 6,43 | 6,77 | 6,56 | 6,50 |
| 60 | 6,65 | 6,43 | 6,48 | 6,86 | 6,50 | 6,53 |
| 72 | 6,59 | 6,41 | 6,43 | 6,64 | 6,43 | 6,37 |
| 84 | 6,70 | 6,46 | 6,47 | 6,75 | 6,55 | 6,54 |
| 96 | 6,47 | 6,54 | 6,32 | 6,55 | 6,37 | 6,40 |
| 108 | 6,50 | 6,30 | 6,28 | 6,64 | 6,50 | 6,45 |
| 120 | 6,65 | 6,44 | 6,48 | 6,53 | 6,53 | 6,54 |
| 132 | 6,67 | 6,47 | 6,42 | 6,93 | 6,53 | 6,46 |
| 144 | 6,43 | 6,30 | 6,32 | 6,60 | 6,39 | 6,33 |
| MEDIA | 6,71 | 6,49 | 6,40 | 6,79 | 6,63 | 6,52 |
| D.E. | 0,17 | 0,16 | 0,11 | 0,16 | 0,27 | 0,10 |

### IV.2.3.1.- Etapa IIIa: Farmacocinética por vía IV e IM en cabras lactantes

En la figura 19 se observan las curvas farmacocinéticas de concentración sérica de CFQ frente al tiempo, luego de la administración de 2 mg/kg por las vías IV e IM, a seis cabras en estado de lactación.

En las tablas 36 y 38 se pueden apreciar los niveles de CFQ en suero.

Luego del análisis farmacocinético empleando un modelo no compartimental, se obtuvieron los parámetros que figuran en las tablas 37 y 39.

Sólo se detectaron concentraciones de CFQ en leche, por encima del límite de cuantificación en algunos animales y tiempos de extracción.

En el caso de la administración intravenosa, se detectaron 0,213 y 0,078 µg/ml de CFQ en el animal “T” a las 2 y 4 h, respectivamente.

Para la administración intramuscular, en el animal “T” se detectaron 0,036, 0,099, 0,107 y 0,112 µg/ml a las 2, 4, 6 y 8 h, y en el animal “Z” 0,252 y 0,209 µg/ml a las 2 y 4 h, respectivamente.

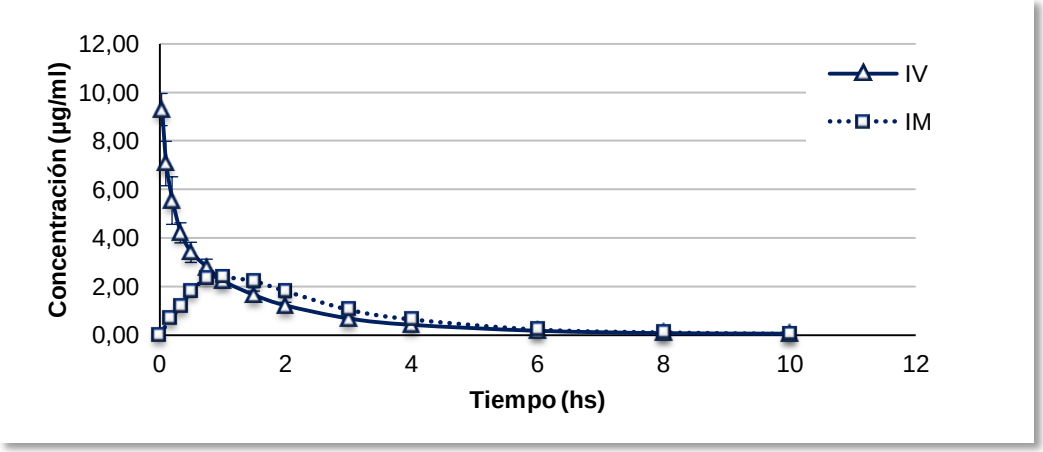



Figura 19: Curvas de concentración y tiempo de cefquinoma en suero, luego de la administración de 2 mg/kg por las vías intravenosa e intramuscular a seis cabras en lactación.

Tabla 36: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabras en lactación.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 8,855 | 8,940 | 9,272 | 9,532 | 10,472 | 8,638 | 9,285 ± 0,662 |
| 0,10 | 5,958 | 6,568 | 7,052 | 7,272 | 8,687 | 6,821 | 7,060 ± 0,917 |
| 0,20 | 4,772 | 5,202 | 5,467 | 5,224 | 7,481 | 5,062 | 5,535 ± 0,980 |
| 0,33 | 3,923 | 4,257 | 3,915 | 3,775 | 4,851 | 4,497 | 4,203 ± 0,413 |
| 0,50 | 2,975 | 3,490 | 3,131 | 3,035 | 3,869 | 3,902 | 3,400 ± 0,416 |
| 0,75 | 2,346 | 2,915 | 2,584 | 2,578 | 3,036 | 3,243 | 2,783 ± 0,336 |
| 1,00 | 2,135 | 2,013 | 2,158 | 2,014 | 2,249 | 2,801 | 2,228 ± 0,295 |
| 1,50 | 1,468 | 1,590 | 1,488 | 1,651 | 1,684 | 1,931 | 1,635 ± 0,168 |
| 2,00 | 1,204 | 1,138 | 0,977 | 1,251 | 1,358 | 1,304 | 1,206 ± 0,136 |
| 3,00 | 0,753 | 0,659 | 0,591 | 0,656 | 0,724 | 0,644 | 0,671 ± 0,058 |
| 4,00 | 0,469 | 0,392 | 0,407 | 0,383 | 0,416 | 0,391 | 0,410 ± 0,031 |
| 6,00 | 0,154 | 0,163 | 0,183 | 0,180 | 0,129 | 0,176 | 0,164 ± 0,020 |
| 8,00 | 0,049 | 0,067 | 0,076 | 0,095 | 0,060 | 0,062 | 0,068 ± 0,016 |
| 10,00 | LOQ | 0,036 | ND | 0,060 | ND | ND | 0,048 ± 0,017 |
| 12,00 | ND | ND | ND | LOQ | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 37: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabras en lactación.

| Parámetro | Unidad | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,53 | 0,42 | 0,41 | 0,39 | 0,53 | 0,55 | 0,47 ± 0,07 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,32 | 1,66 | 1,69 | 1,76 | 1,32 | 1,26 | 1,50 ± 0,23 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 8,86 | 8,94 | 9,27 | 9,53 | 10,47 | 8,64 | 9,28 ± 0,66 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 7,54 | 7,84 | 7,50 | 7,89 | 8,78 | 8,53 | 8,02 ± 0,53 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 7,63 | 7,93 | 7,69 | 8,04 | 8,90 | 8,64 | 8,14 ± 0,52 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 13,05 | 13,76 | 13,55 | 15,50 | 13,45 | 13,88 | 13,86 ± 0,85 |
| TMR | h | 1,71 | 1,74 | 1,76 | 1,93 | 1,51 | 1,61 | 1,71 ± 0,14 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 497,37 | 602,77 | 633,54 | 632,98 | 427,47 | 421,02 | 535,86 ± 99,87 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 447,90 | 437,76 | 458,31 | 478,96 | 339,70 | 371,83 | 422,41 ± 54,35 |
| Cl | ml·kg/h | 262,04 | 252,20 | 260,10 | 248,60 | 224,78 | 231,47 | 246,53 ± 15,24 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 38: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IM a seis cabras en lactación.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,17 | 0,638 | 0,645 | 0,738 | 0,518 | 0,742 | 0,790 | 0,678 ± 0,098 |
| 0,33 | 1,253 | 1,184 | 1,208 | 0,955 | 1,432 | 1,156 | 1,198 ± 0,154 |
| 0,50 | 1,919 | 1,538 | 1,804 | 1,544 | 2,252 | 1,803 | 1,810 ± 0,265 |
| 0,75 | 2,509 | 2,020 | 2,129 | 2,224 | 2,645 | 2,595 | 2,354 ± 0,263 |
| 1,00 | 2,190 | 2,225 | 2,469 | 2,437 | 2,565 | 2,478 | 2,394 ± 0,151 |
| 1,50 | 1,834 | 1,916 | 2,262 | 2,454 | 2,433 | 2,401 | 2,217 ± 0,274 |
| 2,00 | 1,424 | 1,684 | 1,635 | 1,973 | 1,963 | 2,184 | 1,811 ± 0,278 |
| 3,00 | 0,997 | 1,030 | 1,025 | 0,926 | 1,185 | 1,124 | 1,048 ± 0,093 |
| 4,00 | 0,652 | 0,764 | 0,635 | 0,527 | 0,682 | 0,634 | 0,649 ± 0,077 |
| 6,00 | 0,216 | 0,241 | 0,213 | 0,215 | 0,157 | 0,341 | 0,230 ± 0,061 |
| 8,00 | 0,095 | 0,152 | 0,103 | 0,121 | 0,081 | 0,116 | 0,111 ± 0,025 |
| 10,00 | 0,039 | 0,046 | LOQ | 0,084 | LOQ | 0,051 | 0,055 ± 0,020 |
| 12,00 | ND | ND | ND | 0,036 | ND | LOQ | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 39: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IM, en seis cabras lactación.

| Parámetro | Unidad | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_a$ | $h^{-1}$ | 1,48 | 1,87 | 2,14 | 2,07 | 3,11 | 2,86 | 2,26 ± 0,61 |
| $T½\lambda_a$ | h | 0,47 | 0,37 | 0,32 | 0,33 | 0,22 | 0,24 | 0,33 ± 0,09 |
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,46 | 0,44 | 0,47 | 0,34 | 0,56 | 0,44 | 0,45 ± 0,07 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,50 | 1,58 | 1,47 | 2,03 | 1,25 | 1,58 | 1,57 ± 0,26 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 2,51 | 2,22 | 2,47 | 2,45 | 2,64 | 2,60 | 2,48 ± 0,15 |
| $T_{max}$ | h | 0,75 | 1,00 | 1,00 | 1,50 | 0,75 | 0,75 | 0,96 ± 0,29 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 6,78 | 7,19 | 7,02 | 7,33 | 7,75 | 8,16 | 7,37 ± 0,50 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 6,87 | 7,30 | 7,24 | 7,44 | 7,89 | 8,27 | 7,50 ± 0,50 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 17,51 | 20,17 | 18,21 | 20,49 | 18,17 | 21,82 | 19,39 ± 1,68 |
| TMA | h | 0,84 | 1,03 | 0,75 | 0,83 | 0,79 | 1,03 | 0,88 ± 0,12 |
| TMR | h | 2,55 | 2,76 | 2,52 | 2,75 | 2,30 | 2,64 | 2,59 ± 0,17 |
| F | % | 89,98 | 92,04 | 94,14 | 92,47 | 88,70 | 95,73 | 92,18 ± 2,59 |

$\lambda_a$: constante de absorción; $T½\lambda_a$: semivida de absorción; $\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $T_{max}$: tiempo correspondiente a la concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMA: tiempo medio de absorción; TMR: tiempo medio de residencia; F: biodisponibilidad.

### IV.2.3.2.- Etapa IIIb: Farmacocinética por vía IMM en cabras lactantes

En este caso se administraron 10 mg de CFQ por cada medio mamario, en seis cabras en período de lactación, en un régimen multidosis con un intervalo de 12 h y un total de tres administraciones.

Las concentraciones obtenidas en leche se presentan en la figura 20 y la tabla 40. En la tabla 41 se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de analizar las concentraciones de CFQ en leche hasta las primeras doce horas luego de la primera administración IMM. Por otra parte, en la tabla 42 se registran los correspondientes parámetros para lo acontecido luego de la tercera administración, analizados en dos intervalos de tiempo. Los parámetros que surgen del primero de ellos (0 a 12 h) son los empleados para las comparaciones estadísticas con la primera dosis administrada, debido a que se tienen en cuenta la misma cantidad de puntos en el muestreo. A su vez los parámetros correspondientes al intervalo señalado en la tabla 42 como 0 – final (h) son los que fueron calculados para todas las concentraciones cuantificadas en cada animal (60, 72 u 84 h según el caso).

Como las concentraciones séricas de CFQ luego de la administración IMM fueron irregulares, sólo se muestran los niveles individuales en la tabla 43 sin tener en cuenta la media y la desviación de los valores. Se ha calculado el ABC∞ en el suero luego de la tercera administración en los animales R, T, U y Z, siendo sus valores de 7,38; 8,39; 5,78 y 2,59 µg·h/ml, respectivamente (6,04 ± 2,53 µg·h/ml). No se pudo calcular este parámetro para los animales E y Q, debido a la escasa cantidad de concentraciones cuantificadas luego de la tercera administración.

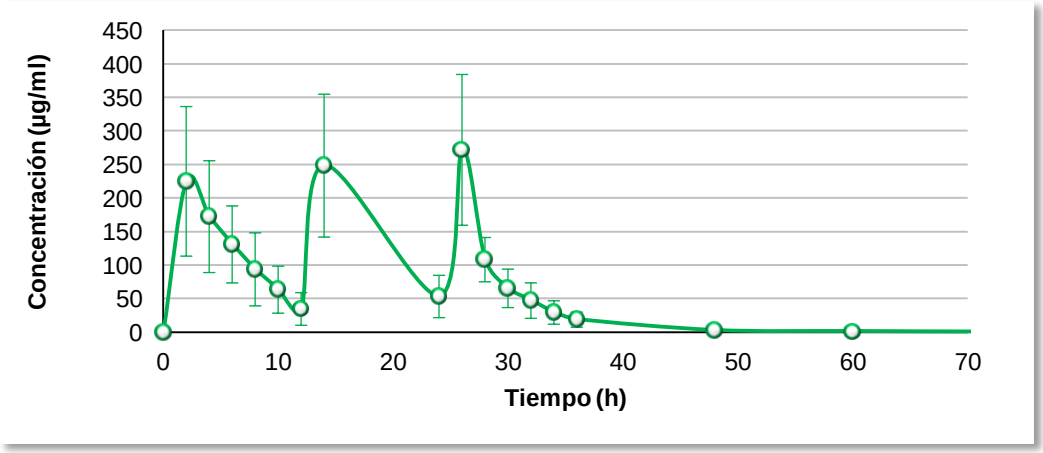



Figura 20: Curva de concentración y tiempo de cefquinoma en leche, luego de la administración de 10 mg por medio mamario cada 12 h en tres administraciones, a seis cabras en lactación.

Tabla 40: Concentraciones en leche de cefquinoma por animal luego de la administración de 10 mg cada 12 h en tres administraciones por la vía intramamaria a seis cabras en lactación.

| TIEMPO (h) | Concentración en leche (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
| **0*** | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 2 | 219,819 | 98,464 | 138,827 | 375,246 | 177,591 | 342,648 | 225,433 ± 111,468 |
| 4 | 215,170 | 83,183 | 94,738 | 222,490 | 128,229 | 292,642 | 172,742 ± 83,352 |
| 6 | 174,481 | 67,831 | 72,929 | 142,438 | 115,977 | 213,961 | 131,270 ± 57,431 |
| 8 | 136,178 | 39,096 | 49,450 | 117,465 | 52,355 | 169,865 | 94,068 ± 54,440 |
| 10 | 116,797 | 33,635 | 36,127 | 64,647 | 37,512 | 94,959 | 63,946 ± 35,063 |
| **12*** | 65,160 | 24,324 | 22,926 | 13,575 | 17,788 | 67,167 | 35,157 ± 24,328 |
| 14 | 276,823 | 102,709 | 210,515 | 398,793 | 179,622 | 324,912 | 248,896 ± 106,461 |
| **24*** | 77,658 | 20,096 | 31,873 | 46,575 | 41,362 | 104,653 | 53,703 ± 31,556 |
| 26 | 333,827 | 106,955 | 282,203 | 422,339 | 181,653 | 307,176 | 272,359 ± 112,399 |
| 28 | 112,905 | 68,007 | 87,801 | 118,204 | 99,692 | 165,192 | 108,633 ± 33,085 |
| 30 | 67,847 | 54,209 | 65,165 | 43,709 | 43,703 | 120,580 | 65,869 ± 28,692 |
| 32 | 45,364 | 46,649 | 38,453 | 33,736 | 22,626 | 98,414 | 47,540 ± 26,410 |
| 34 | 21,409 | 35,688 | 28,392 | 18,355 | 13,735 | 61,698 | 29,879 ± 17,399 |
| 36 | 11,803 | 26,781 | 17,798 | 8,062 | 12,804 | 37,867 | 19,186 ± 11,204 |
| 48 | 1,587 | 2,930 | 2,153 | 1,138 | 3,234 | 5,914 | 2,826 ± 1,706 |
| 60 | 0,654 | 1,538 | 1,195 | 0,385 | 1,124 | 3,111 | 1,334 ± 0,962 |
| 72 | ND | 0,884 | 0,147 | 0,128 | 0,162 | 1,126 | 0,489 ± 0,479 |
| 84 | ND | ND | 0,043 | ND | 0,117 | 0,278 | 0,146 ± 0,121 |
| 96 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 108 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 120 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 132 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 144 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

La administración de cefquinoma se realizó inmediatamente después del vaciado de la glándula mamaria en los tiempos resaltados en negrita y con un asterisco (*). ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 41: Parámetros farmacocinéticos obtenidos en la primera administración intramamaria de 10 mg de cefquinoma en seis cabras en lactación, en un esquema de tres dosis cada 12 h.

| Parámetro | Unidad | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,16 | 0,16 | 0,18 | 0,29 | 0,23 | 0,17 | 0,20 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 4,24 | 4,38 | 3,95 | 2,37 | 3,03 | 4,13 | 3,68 ± 0,80 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 219,82 | 98,46 | 138,83 | 375,25 | 177,59 | 342,65 | 225,43 ± 111,47 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 1.268,28 | 827,36 | 1.006,27 | 2.661,65 | 1.373,64 | 2.842,63 | 1.663,30 ± 866,94 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 1.272,26 | 981,22 | 1.136,90 | 2.707,98 | 1.451,52 | 3.242,56 | 1.798,74 ± 939,73 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 5.963,90 | 6.283,24 | 6.289,25 | 9.039,54 | 6.204,72 | 18.882,8 | 8.777,24 ± 5.082,0 |
| TMR | h | 4,69 | 6,40 | 5,53 | 3,34 | 4,27 | 5,82 | 5,01 ± 1,12 |
| Cl | ml·kg/h | 11,23 | 14,56 | 12,57 | 5,28 | 9,84 | 4,41 | 9,65 ± 4,04 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; Cl: aclaramiento en leche.

Tabla 42: parámetros farmacocinéticos obtenidos en la tercera administración intramamaria de 10 mg de cefquinoma en seis cabras en lactación, luego de un esquema de tres dosis cada 12 h.

| Parámetro | Unidad | Intervalo analizado (h) | E | Q | R | T | U | Z | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0 - 12 | 0,30 | 0,14 | 0,19 | 0,36 | 0,21 | 0,20 | 0,23 ± 0,08 |
| | | 0 - final | 0,13 | 0,10 | 0,13 | 0,13 | 0,11 | 0,11 | 0,12 ± 0,01 |
| $T½\lambda_e$ | h | 0 - 12 | 2,33 | 4,99 | 3,60 | 1,94 | 3,31 | 3,52 | 3,28 ± 1,08 |
| | | 0 - final | 5,19 | 6,64 | 5,35 | 5,51 | 6,60 | 6,34 | 5,94 ± 0,66 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 0 - 12 | 333,83 | 106,95 | 282,2 | 422,34 | 181,65 | 307,18 | 272,36 ± 112,40 |
| | | 0 - final | 333,83 | 106,95 | 282,20 | 422,34 | 181,65 | 307,18 | 272,36 ± 112,40 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 0 - 12 | 1.748,84 | 792,13 | 1.514,10 | 2.095,69 | 1.079,39 | 1.983,78 | 1.535,65 ± 514,08 |
| | | 0 - final | 1.841,36 | 1.021,95 | 1.756,49 | 2.256,78 | 1.337,01 | 2.594,56 | 1.801,36 ± 576,76 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 0 - 12 | 1.788,47 | 985,12 | 1.606,50 | 2.118,21 | 1.140,61 | 2.175,89 | 1.635,80 ± 493,39 |
| | | 0 - final | 1.846,26 | 1.030,42 | 1.756,82 | 2.257,80 | 1.338,12 | 2.597,10 | 1.804,42 ± 575,23 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 0 - 12 | 4.957,09 | 7.110,66 | 5.598,33 | 4.496,35 | 3.866,32 | 10.540,0 | 6.094,79 ± 2.443,52 |
| | | 0 - final | 6.009,31 | 7.582,74 | 6.550,26 | 5.331,44 | 5.390,68 | 13.958,2 | 7.470,44 ± 3.285,91 |
| TMR | h | 0 - 12 | 2,77 | 7,22 | 3,48 | 2,12 | 3,39 | 4,84 | 3,97 ± 1,83 |
| | | 0 - final | 3,25 | 7,36 | 3,73 | 2,36 | 4,03 | 5,37 | 4,35 ± 1,77 |
| Cl | ml·kg/h | 0 - 12 | 7,99 | 14,50 | 8,89 | 6,74 | 12,52 | 6,57 | 9,54 ± 3,26 |
| | | 0 - final | 7,74 | 13,86 | 8,13 | 6,33 | 10,68 | 5,50 | 8,71 ± 3,09 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; Cl: aclaramiento en leche.

Tabla 43: Concentraciones en suero de cefquinoma por animal luego de la administración de 10 mg cada 12 h en tres administraciones por la vía intramamaria a seis cabras en lactación.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E | Q | R | T | U | Z |
| **0*** | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 0,5 | ND | ND | ND | 0,424 | ND | ND |
| 1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 1,5 | ND | ND | ND | 0,462 | ND | ND |
| 2 | ND | ND | ND | 0,425 | 0,4 | LOQ |
| 4 | ND | ND | ND | 0,45 | 0,517 | 0,451 |
| 6 | ND | ND | 0,263 | 0,634 | 0,514 | 0,405 |
| 8 | ND | LOQ | ND | 0,555 | 0,342 | 0,555 |
| 10 | ND | 0,059 | ND | ND | 0,554 | ND |
| **12*** | ND | 0,044 | 0,328 | 0,518 | 0,47 | ND |
| 14 | LOQ | LOQ | 0,378 | 0,318 | 0,514 | 0,489 |
| **24*** | ND | 0,058 | 0,228 | 0,372 | 0,375 | 0,290 |
| 24,5 | LOQ | ND | 0,336 | 0,414 | 0,425 | 0,226 |
| 25 | 0,190 | ND | LOQ | 0,548 | 0,560 | 0,386 |
| 25,5 | LOQ | ND | 0,263 | 0,600 | 0,446 | 0,522 |
| 26 | ND | ND | 0,349 | 0,323 | 0,499 | 0,225 |
| 28 | ND | ND | 0,305 | 0,449 | 0,501 | 0,483 |
| 30 | ND | 0,068 | 0,286 | 0,472 | 0,365 | 0,390 |
| 32 | ND | 0,159 | ND | 0,342 | 0,269 | ND |
| 34 | ND | 0,047 | ND | LOQ | 0,220 | ND |
| 36 a 144 | ND | ND | ND | ND | LOQ | ND |

La administración de cefquinoma se realizó justo después del vaciado de la glándula mamaria en los tiempos resaltados en negrita y con un asterisco (*). ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

### IV.2.4.- Etapa IV: Farmacocinética de cefquinoma en cabritos a diferentes edades

En la figura 21 se muestran las curvas de disposición sérica y en la tabla 44 las medias y los desvíos estándar de las concentraciones de CFQ, administrada por vía intravenosa a la dosis de 2 mg/kg en cabritos a los 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad (n = 6 por grupo).

En las tablas 67 a 71 del Anexo se pueden apreciar los datos para cada animal individualmente.

Los parámetros farmacocinéticos correspondientes a esta etapa, se presentan de forma resumida en la tabla 45 e individualmente por animal en las tablas 72 a la 76 del Anexo.

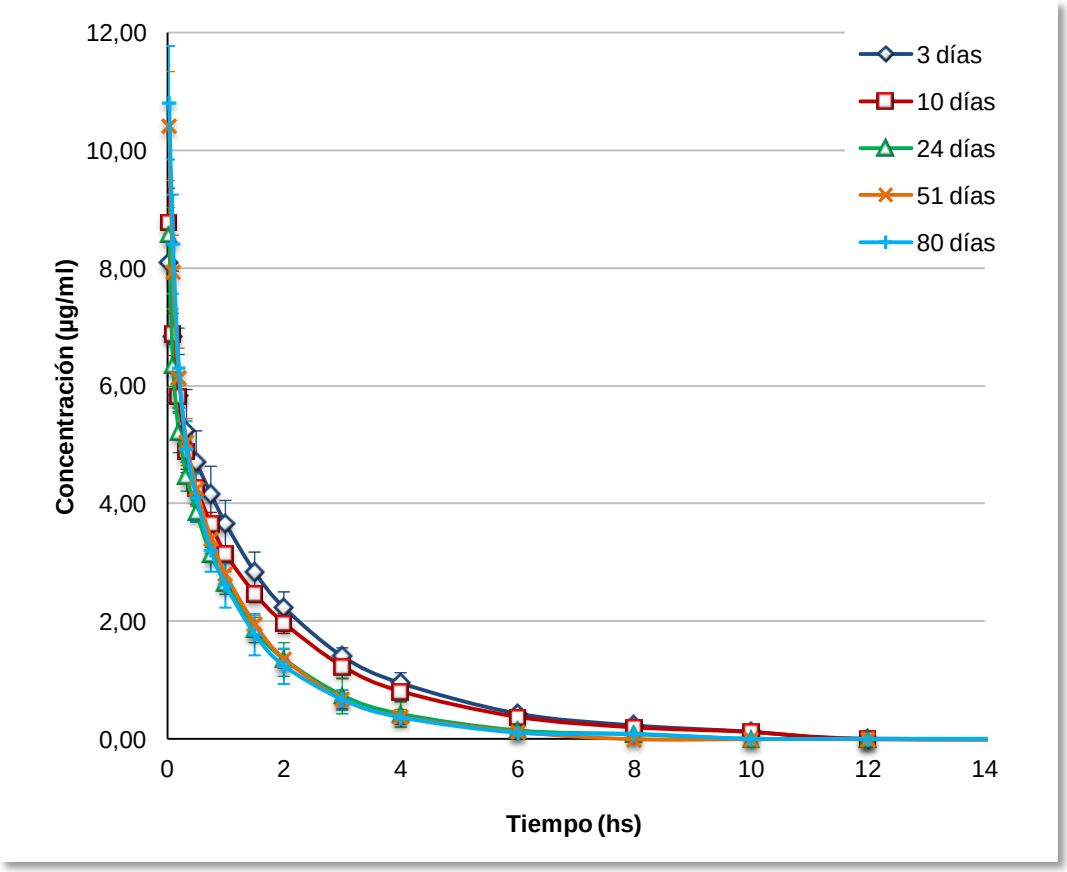



Figura 21: Curvas de concentración y tiempo de cefquinoma en suero, luego de la administración de 2 mg/kg por la vía intravenosa a seis cabritos a los 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad.

Tabla 44: Concentraciones séricas (medias ± desvíos estándar) de cefquinoma por grupos de cabritos (n = 6) de 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad, a los cuales se les administró 2 mg/kg por la vía IV

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) MEDIA ± D.E. | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3 días | 10 días | 24 días | 50 días | 80 días |
| 0,00 | - | - | - | - | - |
| 0,03 | 8,085 ± 1,154 | 8,775 ± 0,590 | 8,566 ± 0,469 | 10,420 ± 0,925 | 10,814 ± 0,964 |
| 0,10 | 6,836 ± 1,120 | 6,879 ± 0,359 | 6,353 ± 0,365 | 7,938 ± 0,628 | 8,413 ± 0,842 |
| 0,20 | 5,834 ± 0,705 | 5,818 ± 0,255 | 5,206 ± 0,335 | 6,144 ± 0,505 | 6,306 ± 0,679 |
| 0,33 | 5,238 ± 0,706 | 4,884 ± 0,296 | 4,464 ± 0,246 | 5,049 ± 0,398 | 4,937 ± 0,468 |
| 0,50 | 4,708 ± 0,532 | 4,260 ± 0,273 | 3,847 ± 0,151 | 4,253 ± 0,298 | 4,107 ± 0,413 |
| 0,75 | 4,158 ± 0,481 | 3,650 ± 0,206 | 3,133 ± 0,129 | 3,407 ± 0,253 | 3,207 ± 0,359 |
| 1,00 | 3,660 ± 0,399 | 3,141 ± 0,147 | 2,655 ± 0,192 | 2,802 ± 0,206 | 2,614 ± 0,376 |
| 1,50 | 2,835 ± 0,347 | 2,467 ± 0,144 | 1,858 ± 0,215 | 1,959 ± 0,140 | 1,780 ± 0,352 |
| 2,00 | 2,233 ± 0,272 | 1,965 ± 0,165 | 1,357 ± 0,286 | 1,366 ± 0,159 | 1,241 ± 0,301 |
| 3,00 | 1,407 ± 0,147 | 1,231 ± 0,200 | 0,737 ± 0,303 | 0,680 ± 0,157 | 0,668 ± 0,167 |
| 4,00 | 0,952 ± 0,180 | 0,805 ± 0,163 | 0,423 ± 0,214 | 0,381 ± 0,128 | 0,365 ± 0,065 |
| 6,00 | 0,434 ± 0,068 | 0,370 ± 0,079 | 0,144 ± 0,059 | 0,122 ± 0,033 | 0,105 ± 0,028 |
| 8,00 | 0,233 ± 0,052 | 0,192 ± 0,038 | 0,078 ± 0,012 | - | - |
| 10,00 | 0,126 ± 0,049 | 0,116 ± 0,030 | - | - | - |
| 12,00 | - | - | - | - | - |
| 24,00 | - | - | - | - | - |
| 36,00 | - | - | - | - | - |
| 48,00 | - | - | - | - | - |

Tabla 45: Parámetros farmacocinéticos (medias ± desvíos estándar) de cefquinoma por grupos de cabritos (n = 6) de 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad, a los cuales se les administró 2 mg/kg por la vía IV

| Parámetro | Unidad | MEDIA ± D.E. | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 días | 10 días | 24 días | 50 días | 80 días |
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,34 ± 0,05 | 0,34 ± 0,07 | 0,52 ± 0,02 | 0,61 ± 0,06 | 0,62 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 2,12 ± 0,42 | 2,08 ± 0,44 | 1,34 ± 0,05 | 1,14 ± 0,11 | 1,12 ± 0,10 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 8,09 ± 1,15 | 9,23 ± 1,00 | 8,57 ± 0,47 | 10,48 ± 0,80 | 11,35 ± 1,45 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 13,34 ± 1,27 | 11,81 ± 0,88 | 8,53 ± 1,11 | 8,98 ± 0,51 | 8,70 ± 1,27 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 13,75 ± 1,14 | 12,21 ± 0,85 | 8,70 ± 1,09 | 9,18 ± 0,58 | 8,85 ± 1,26 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 34,20 ± 4,89 | 28,86 ± 3,91 | 13,81 ± 4,17 | 12,75 ± 2,21 | 11,96 ± 2,46 |
| TMR | h | 2,50 ± 0,41 | 2,36 ± 0,23 | 1,56 ± 0,28 | 1,38 ± 0,16 | 1,34 ± 0,11 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 450 ± 118,23 | 495,01 ± 114,57 | 451,78 ± 54,06 | 357,56 ± 22,57 | 371,97 ± 72,94 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 367,29 ± 81,24 | 387,73 ± 39,18 | 357,07 ± 24,83 | 300,49 ± 19,28 | 307,25 ± 37,67 |
| Cl | ml·kg/h | 146,32 ± 12,25 | 164,49 ± 10,85 | 233,06 ± 29,32 | 218,6 ± 13,94 | 229,87 ± 33,36 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

## IV.3.- Estudio de prevalencia y análisis farmacodinámico en leche

### IV.3.1.- Etapa V: Aislamiento de estafilococos coagulasa negativos en mastitis subclínicas caprinas y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma

Aislamientos bacterianos y prevalencia de mastitis subclínica

El total de cepas de ECN aisladas de todas las muestras de leche fueron 110 (52 del medio mamario izquierdo y 58 del derecho). Sin embargo como algunas cabras presentaban mastitis en sus dos medios, se registraron 90 casos (animales) de mastitis subclínica entre las 651 cabras que intervinieron en el muestreo, lo que representa una prevalencia del 13,82 % de la población caprina lechera de la región norte de la provincia de Córdoba, Argentina. El valor de prevalencia más alto fue del 38,46 % (10 de 26 animales con aislamiento positivo, en el establecimiento n° 18 localizado en San Pedro, Río Seco) y el más bajo del 7,50 % (3/40, establecimiento n° 12 localizado en Campo Grande, Río Seco).

La mayoría de los casos resultaron ser infecciones intramamarias unilaterales, existiendo similares proporciones de casos entre el medio mamario izquierdo 8,02 % (52/648) y el derecho 8,98 % (58/646).

El número de casos por establecimiento (por animal y por medio mamario), puede observarse en la tabla 46, como así también la prevalencia calculada. En la misma tabla también se puede apreciar que en cuatro establecimientos, todas las muestras resultaron negativas a los aislamientos bacterianos.

Concentración inhibitoria mínima

Las 110 diferentes cepas de ECN fueron sensibles a la CFQ en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 1,6 µg/ml (tabla 47).

A partir de los datos acumulados de las cepas inhibidas, se calculó la $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$, correspondientes a los valores inferiores a 0,40 y 0,80 µg/ml respectivamente.

La frecuencia de cepas regionales inhibidas por CFQ responde a una curva normal de distribución figura 22.

Tabla 46: Casos de mastitis subclínica en muestras de leche de cabras procedentes de establecimientos ubicados en el norte de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Establecimiento N° | Casos por medio mamario [1] Izquierdo | Derecho | Casos por animal [1 y 2] | Prevalencia |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 9 | 15 | 30,61 % (15/49) |
| 2 | ND | ND | ND | ND |
| 3 | ND | ND | ND | ND |
| 4 | ND | ND | ND | ND |
| 5 | 11 | 10 | 17 | 36,17 % (17/47) |
| 6 | 3 | 3 | 5 | 9,80 % (5/51) |
| 7 | 1 | ND | 1 | 7,69 % (1/13) |
| 8 | 3 | 3 | 5 | 11,63 % (5/43) |
| 9 | 2 | 1 | 3 | 10,34 % (3/29) |
| 10 | 3 | 6 | 6 | 14,29 % (6/42) |
| 11 | ND | ND | ND | ND |
| 12 | 1 | 2 | 3 | 7,50 % (3/40) |
| 13 | 2 | 2 | 4 | 10,00 % (4/40) |
| 14 | 2 | 3 | 3 | 13,64 % (3/22) |
| 15 | 9 | 9 | 14 | 17,72 % (14/79) |
| 16 | 1 | 2 | 3 | 13,64 % (3/22) |
| 17 | ND | 1 | 1 | 16,67 % (1/6) |
| 18 | 5 | 7 | 10 | 38,46 % (10/26) |
| **Totales** | **52** | **58** | **90** | **13,82 % (90/651)** |

[1] Caso: mastitis subclínica con aislamiento positivo a estafilococos coagulasa negativo en leche (ECN). [2] Un animal se consideró como "caso" cuando al menos uno de los dos medios mamarios resultó positivo a dicho aislamiento. ND: ECN no detectados. (entre paréntesis casos positivos frente a número total de animales muestreados).

Tabla 47: Distribución de la concentración inhibitoria mínima (CIM), $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ de la cefquinoma (CFQ) frente a cepas de estafilococos coagulasa negativos

| Número de cepas inhibidas con una CIM (µg/ml) de CFQ de: | | | | | µg/ml | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,10 | 0,20 | 0,40 | 0,80 | 1,60 | $CIM_{50}$ | $CIM_{90}$ |
| 4 | 17 | 71 | 17 | 1 | **< 0,40** | **< 0,80** |

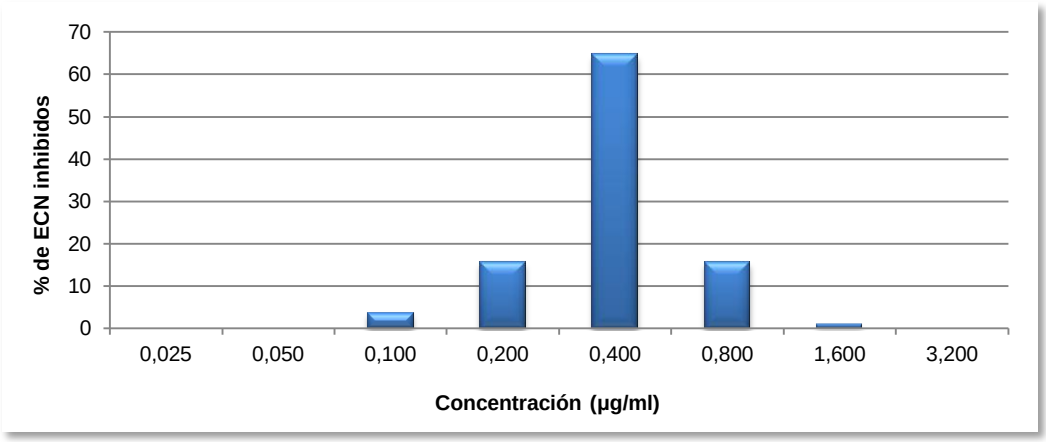



Figura 22: Distribución normal de las concentraciones inhibitorias mínimas de cefquinoma frente a estafilococos coagulasa negativos aislados de la leche caprina del norte de Córdoba, Argentina.

## IV.4.- Análisis estadístico de las modificaciones producidas por el estado fisiológico en la farmacocinética de la cefquinoma.

### IV.4.1.- Edad

Los distintos valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en la etapa IV, fueron comparados con el objeto de establecer si había diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

En las figuras 23 a 30 se pueden observar los valores de las medias (± D.E.) de los diferentes parámetros farmacocinéticos obtenidos para los cabritos de 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad. Los grupos etarios que se señalan con el punto del mismo color indican que no existen diferencias entre los mismos ($p > 0,05$). Además en cada figura se trazó la recta de regresión que señala la tendencia de cada parámetro conforme el cabrito va creciendo.

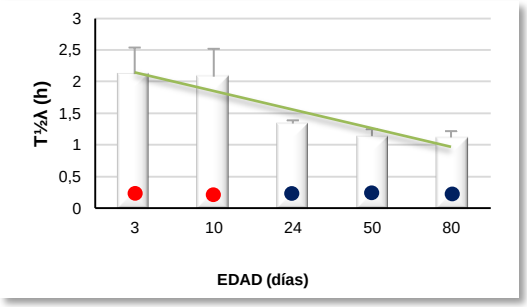



Figura 23: Comparaciones por edad de la semivida de eliminación ($T½λ_e$) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

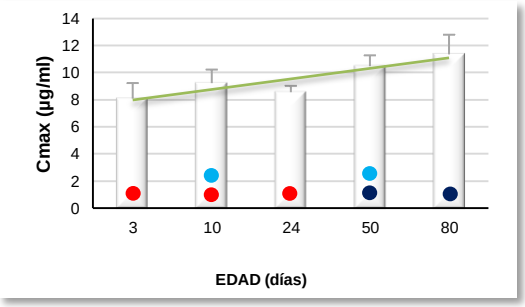



Figura 24: Comparaciones por edad de la concentración máxima ($C_{max}$) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

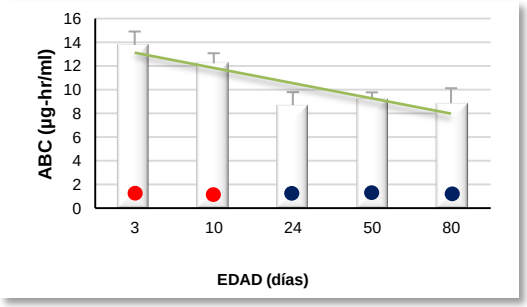



Figura 25: Comparaciones por edad del área bajo la curva (ABC) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

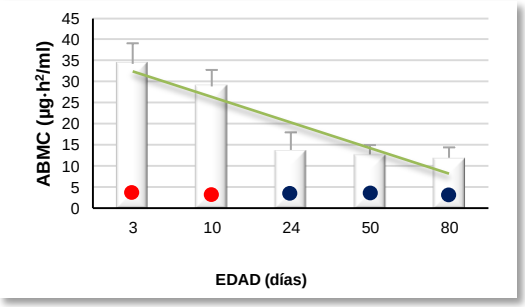



Figura 26: Comparaciones por edad del área bajo el momento de la curva (ABMC) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

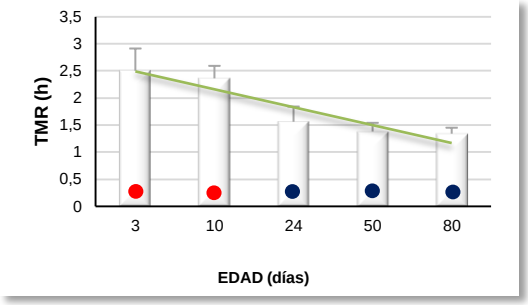



Figura 27: Comparaciones por edad del tiempo medio de residencia (TMR) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

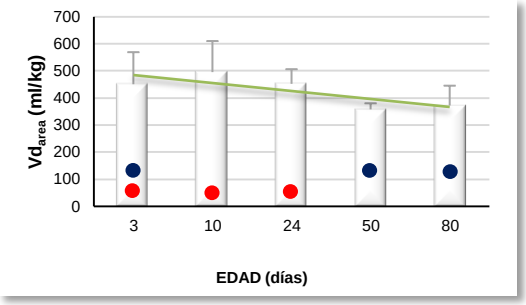



Figura 28: Comparaciones por edad del volumen aparente de distribución calculado por el método del área ($Vd_{área}$) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

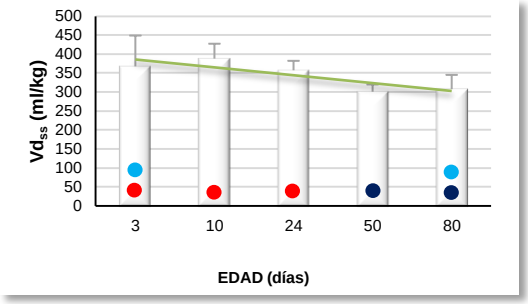



Figura 29: Comparaciones por edad del volumen aparente de distribución en el estado estacionario ($Vd_{ss}$) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

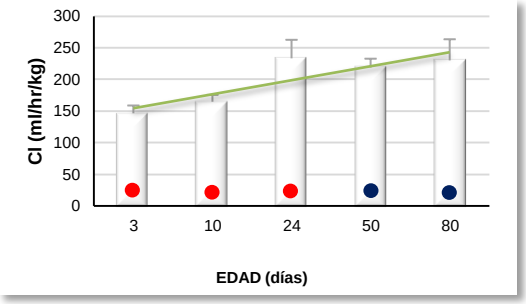



Figura 30: Comparaciones por edad del aclaramiento en suero (Cl) de la cefquinoma en caprinos ($p < 0,05$).

### IV.4.2.- Sexo

Si bien este análisis no estaba incluido dentro de los objetivos iniciales de la tesis, y debido a que entre los animales de la etapa IV había cuatro machos, se procedió a comparar las medias de los parámetros farmacocinéticos de estos cuatro machos (de 80 días) con las correspondientes de un grupo de ocho hembras (las dos restantes de la etapa IV, de 80 días, más seis de la etapa I vía IV).

Luego de comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos, se realizó un ANOVA con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni para los parámetros Cl, $Vd_{ss}$, $Vd_{area}$, TMR, ABC y $C_{max}$.

En el caso de la $T½\lambda_e$, se procedió a realizar un análisis de Kruskall Wallis por no distribuirse normalmente los datos. En todos los análisis, no se establecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre machos y hembras.

### IV.4.3.- Vacías, gestantes y lactantes: vía intravenosa

En este caso se compararon los parámetros farmacocinéticos de la CFQ administrada por la vía IV en las distintas etapas de la cabra adulta, es decir vacías (etapa I), gestantes (etapa IIa) y en estado de lactación (etapa IIIa).

En la figura 31 se pueden apreciar las diferentes curvas farmacocinéticas para estas etapas y en las figuras 32 a 36, las comparaciones de los parámetros entre los diferentes grupos. Sobre las figuras se indican con puntos del mismo color, la ausencia de diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$). Por otra parte, no están representados los parámetros $Vd_{ss}$, $Vd_{area}$ y $T½\lambda_e$, debido a que no se observan diferencias en los tres estadios fisiológicos de las cabras.

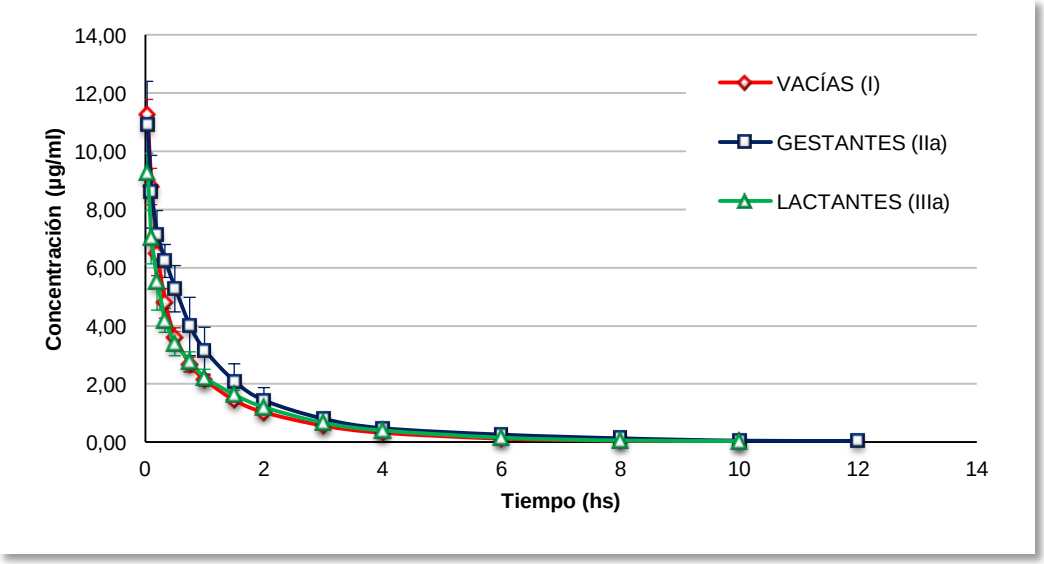



Figura 31: Curvas de disposición de cefquinoma en suero caprino en las etapas I, IIa y IIIa, tras la administración de 2 mg/kg por vía IV (n = 6 por grupo).

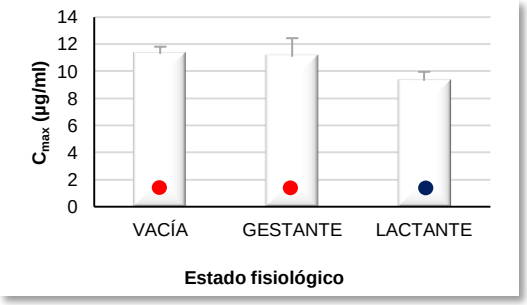



Figura 32: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes de la concentración máxima ($C_{max}$) de la cefquinoma vía IV en caprinos ($p < 0,05$).

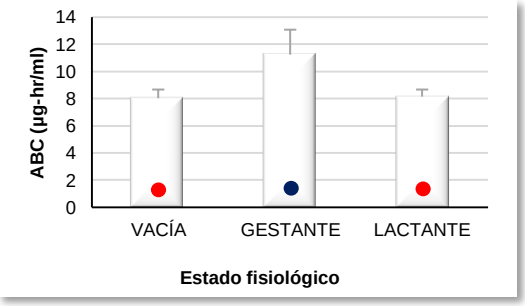



Figura 33: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del área bajo la curva (ABC) de la cefquinoma vía IV en caprinos ($p < 0,05$).

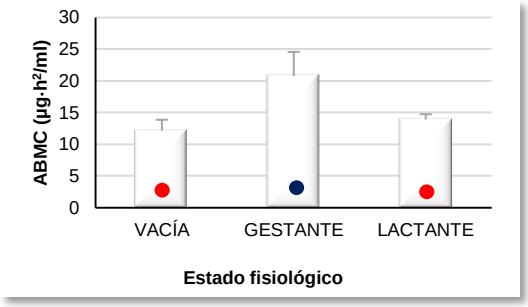



Figura 34: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del área bajo el momento de la curva (ABMC) de la cefquinoma vía IV en caprinos ($p < 0,05$).

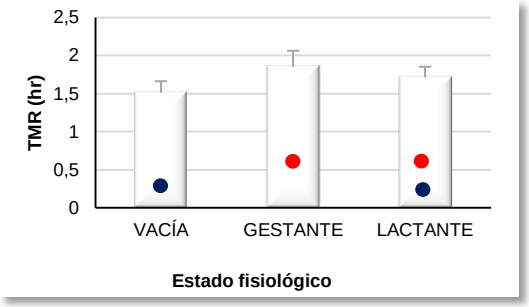



Figura 35: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del tiempo medio de residencia (TMR) de la cefquinoma vía IV en caprinos ($p < 0,05$).

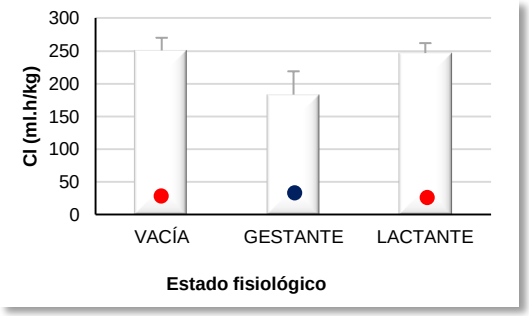



Figura 36: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del aclaramiento en suero (Cl) de la cefquinoma vía IV en caprinos ($p < 0,05$).

### IV.4.4.- Vacías, gestantes y lactantes: vía intramuscular

De igual manera que para la vía de administración IV, se evaluó el efecto del estado de gestación (o su ausencia) y lactación sobre la farmacocinética de la CFQ administrándola por la ruta IM a la dosis de 2 mg/kg en grupos 6 cabras de las etapas I, IIa y IIIa.

Se pueden apreciar la diferentes curvas concentración frente al tiempo para la vía IM en la figura 37 y las comparaciones de los parámetros farmacocinéticos $T½\lambda_e$, $C_{max}$, TMA, TMR, ABMC y ABC en las figuras 38 a 43, respectivamente.

Sobre los gráficos de barras se señalan con puntos del mismo color aquellos grupos en donde no se hallaron diferencias significativas entre las medias de los parámetros farmacocinéticos ($p > 0,05$). Para $T½\lambda_a$, $T_{max}$ y F no se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos.

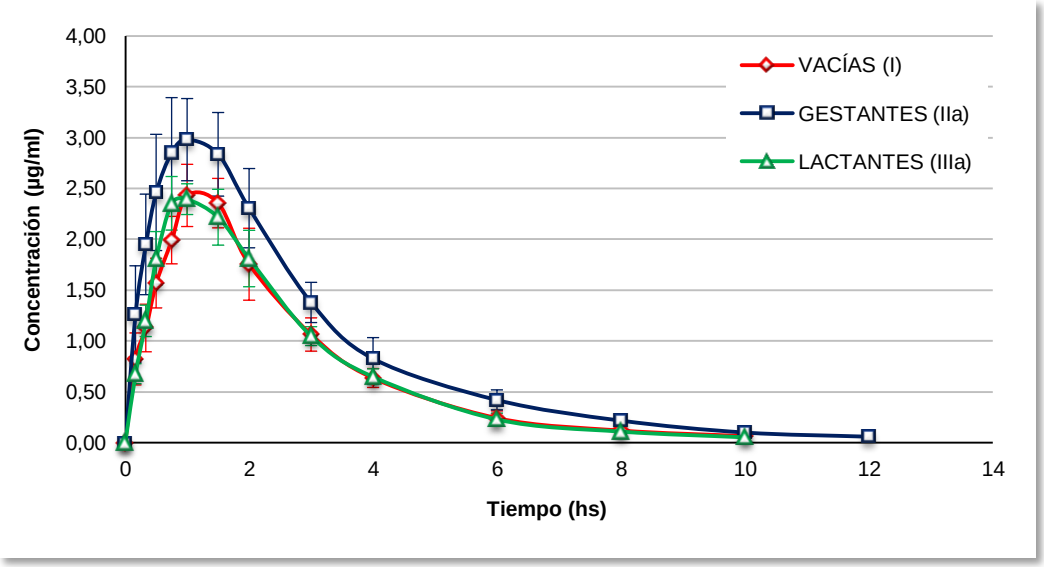



Figura 37: Curvas de disposición de cefquinoma en suero caprino en las etapas I, IIa y IIIa, tras la administración de 2 mg/kg por vía IM (n = 6 por grupo).

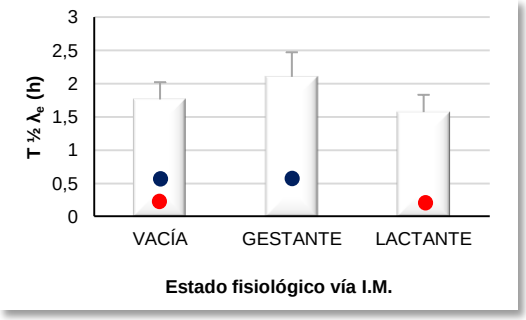



Figura 38: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes de la semivida de eliminación ($T½\lambda_e$) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

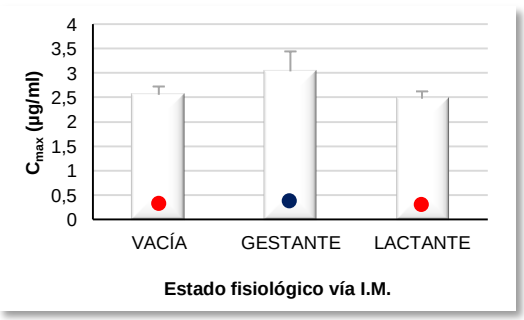



Figura 39: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes de la concentración máxima ($C_{max}$) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

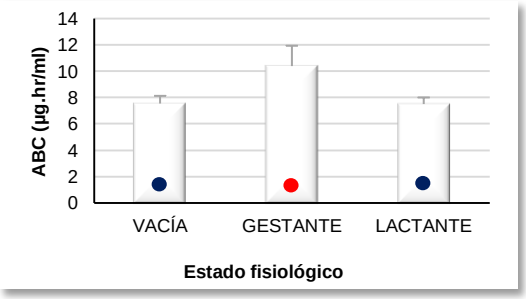



Figura 40: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del área bajo la curva (ABC) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

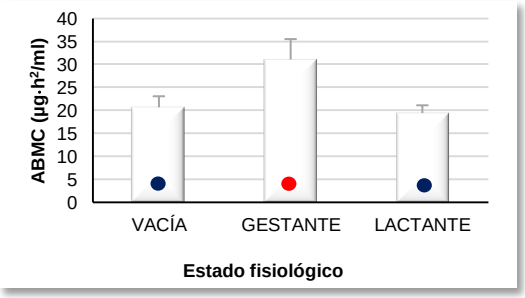



Figura 41: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del área bajo el momento de la curva (ABMC) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

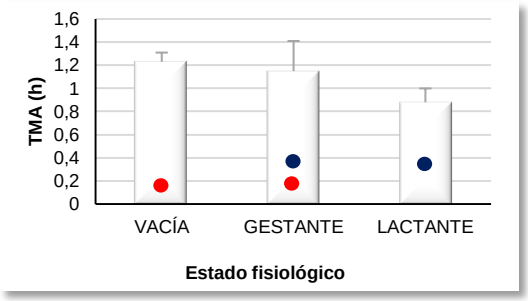



Figura 42: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del tiempo medio de absorción (TMA) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

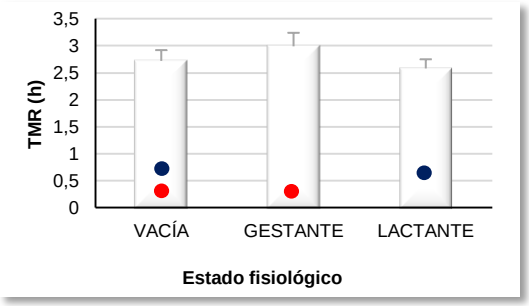



Figura 43: Comparaciones en cabras vacías, gestantes y lactantes del tiempo medio de residencia (TMR) de la cefquinoma vía IM en caprinos ($p < 0,05$).

### IV.4.5.- Lactantes: vía intramamaria

No se ha encontrado ninguna diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los diferentes parámetros farmacocinéticos correspondientes a la primera y última administración de CFQ por medio mamario, comparando la misma cantidad de horas de muestreo (0 - 12 h).

## IV.5.- Integración farmacocinética / farmacodinámica

Los resultados de los diferentes parámetros T > CIM de cada etapa, expresados en valores medios con sus respectivos desvíos estándares (en horas), se presentan entre las tablas 48 a 50. A su vez, los valores de este parámetro por cada animal y etapa se detallan en el Anexo entre las tablas 77 a la 85.

En aquellos casos donde varios trabajos informan diferentes $CIM_{90}$ de CFQ del mismo patógeno, se ha considerado para el cálculo de T > CIM (valor medio ± desviación estándar) el valor más alto del conjunto informado por las investigaciones (peor caso posible). Así por ejemplo en el caso de *Pasteurella multocida* se consideró una $CIM_{90} \leq$ 0,120 µg/ml, siendo que Melnikow *et al* (2008) informan el resultado de la CIM de un caso clínico por dicho agente de 0,063 µg/ml.

En el caso de *E. coli*, se tomaron como referencia dos valores de $CIM_{90}$, debido a que el informado por Thomas *et al* (2004) es superior al resto (Böttner *et al*, 1995; Deshpande *et al* 2000; Sheldon *et al* 2004; Thomas *et al*, 2006) y son valores de 41 cepas (comparadas con las 234 restantes) halladas en Francia que produjeron casos de septicemias o enterotoxemias en terneros menores de 10 días de edad.

Los patógenos que figuran en dichas tablas, si bien pertenecen a diferentes especies animales (bovinos mayoritariamente), son comunes en los caprinos, produciendo patologías respiratorias, digestivas, del aparato reproductor y septicemias, entre otras. En general son cepas gramnegativas anaerobias facultativas procedentes de distintos aislamientos realizados principalmente en Europa y América.

Para las vías IV e IM, no se incluyeron los patógenos que figuraban en las fuentes bibliográficas, con $CIM_{90}$ superiores a 1 µg/ml debido a que el tiempo en el cual la CFQ permanece por encima de estas CIM en suero es muy breve (a la dosis de 2 mg/kg ensayada).

Sólo se realizó el cálculo del parámetro FC / FD en el suero de la etapa IIIa y en la leche de la etapa IIIb, debido a las escasas concentraciones de CFQ detectadas en la leche y el suero de las etapas IIIa y IIIb, respectivamente.

Las frecuencias de administración de CFQ (2 mg/kg IV o IM), se presentan en la tabla 51, teniendo en cuenta un T > CIM superior o igual al 50 % del intervalo de dosificación.

Tabla 48: Tiempo en horas T > CIM, calculados para la cefquinoma administrada en forma intravenosa (IV) e intramuscular (IM), frente a microorganismos gramnegativos y grampositivos, en cabras adultas vacías (etapa I), gestantes (etapa IIa) y lactantes (etapa IIIa).

| **Microorganismo** | **$CIM_{90}$ (µg/ml) (n)** | **T > CIM (h)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Etapa I (vacías)** | | **Etapa IIa (gestantes)** | | **Etapa IIIa (lactantes)** | |
| | | **IV** | **IM** | **IV** | **IM** | **IV** | **IM** |
| *Escherichia coli* [1, 2, 6, 8] | ≤ 0,250 (234) | 4,8 ± 0,4 | 6,5 ± 0,7 | 6,2 ± 1,1 | 7,7 ± 0,8 | 5,5 ± 0,2 | 6,6 ± 0,4 |
| *Escherichia coli* [7] | 1,000 (41) | 2,1 ± 0,2 | 2,8 ± 0,3 | 2,7 ± 0,6 | 3,6 ± 0,4 | 2,4 ± 0,3 | 2,7 ± 0,4 |
| *Enterobacter* spp [4] | 0,781 (40) | 2,6 ± 0,2 | 3,6 ± 0,3 | 3,3 ± 0,6 | 4,4 ± 0,6 | 2,9 ± 0,2 | 3,6 ± 0,3 |
| *Proteus mirabilis* [4] | 0,195 (27) | 5,6 ± 0,3 | 7,3 ± 0,6 | 7,1 ± 1,2 | 8,6 ± 0,6 | 6,1 ± 0,3 | 7,7 ± 0,8 |
| *Salmonella* spp [1, 4] | ≤ 0,500 (198) | 3,2 ± 0,3 | 4,7 ± 0,5 | 4,0 ± 0,8 | 5,5 ± 1,0 | 3,7 ± 0,1 | 4,7 ± 0,2 |
| *Citrobacter* spp [4] | 0,195 (40) | 5,6 ± 0,3 | 7,3 ± 0,6 | 7,1 ± 1,2 | 8,6 ± 0,6 | 6,1 ± 0,3 | 7,7 ± 0,8 |
| *Mannheimia haemolytica* [1, 3,9] | ≤ 0,120 (221) | 6,8 ± 0,3 | 8,4 ± 0,9 | 8,0 ± 1,3 | 9,7 ± 0,8 | 6,8 ± 0,6 | 7,8 ± 0,4 |
| *Pasteurella multocida* [1, 5, 9] | ≤ 0,120 (326) | 6,8 ± 0,3 | 8,4 ± 0,9 | 8,0 ± 1,3 | 9,7 ± 0,8 | 6,8 ± 0,6 | 7,8 ± 0,4 |
| *Klebsiella pneumoniae* [2] | 0,500 (98) | 3,2 ± 0,3 | 4,7 ± 0,5 | 4,0 ± 0,8 | 5,5 ± 1,0 | 3,7 ± 0,1 | 4,7 ± 0,2 |
| *Staphylococcus aureus / intermedius* [8] | 0,500 (11) | 3,2 ± 0,3 | 4,7 ± 0,5 | 4,0 ± 0,8 | 5,5 ± 1,0 | 3,7 ± 0,1 | 4,7 ± 0,2 |
| *Arcanobacterium pyogenes* [6] | < 0,125 (22) | 6,8 ± 0,3 | 8,4 ± 0,9 | 8,0 ± 1,3 | 9,7 ± 0,8 | 6,8 ± 0,6 | 7,8 ± 0,4 |
| *Clostridium perfringens* [8] | 1,000 (10) | 2,1 ± 0,2 | 2,8 ± 0,3 | 2,7 ± 0,6 | 3,6 ± 0,4 | 2,4 ± 0,3 | 2,7 ± 0,4 |

(n): número de cepas testadas. [1]Böttner *et al* (1995), [2]Deshpande *et al* (2000), [3]Katsuda *et al* (2012), [4]Limbert *et al* (1991), [5]Melnikow *et al* (2008), [6]Sheldon *et al* (2004), [7]Thomas *et al* (2004), [8]Thomas *et al* (2006), [9]Wallmann *et al*, (2003).

Tabla 49: Tiempo en horas T > CIM, calculados para la cefquinoma administrada en forma intravenosa, frente a microorganismos gramnegativos y grampositivos, en los cabritos en crecimiento de la etapa IV.

| Microorganismo | $CIM_{90}$ (µg/ml) (n) | T > CIM (h) etapa IV (cabritos) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 días | 10 días | 24 días | 50 días | 80 días |
| *Escherichia coli* [1, 2, 6, 8] | ≤ 0,250 (234) | 8,1 ± 0,6 | 7,4 ± 0,7 | 5,1 ± 1,1 | 5,2 ± 0,5 | 5,0 ± 0,4 |
| *Escherichia coli* [7] | 1,000 (41) | 3,6 ± 0,8 | 3,5 ± 0,5 | 2,5 ± 0,6 | 2,5 ± 0,2 | 2,9 ± 0,4 |
| *Enterobacter* spp [4] | 0,781 (40) | 4,6 ± 0,4 | 4,4 ± 0,5 | 3,1 ± 0,6 | 3,0 ± 0,3 | 2,9 ± 0,4 |
| *Proteus mirabilis* [4] | 0,195 (27) | 8,8 ± 0,6 | 8,2 ± 0,6 | 5,8 ± 1,0 | 5,6 ± 0,5 | 5,4 ± 0,5 |
| *Salmonella* spp [1, 4] | ≤ 0,500 (198) | 7,3 ± 1,4 | 5,5 ± 0,5 | 3,8 ± 0,9 | 3,7 ± 0,5 | 3,4 ± 0,4 |
| *Citrobacter* spp [4] | 0,195 (40) | 8,8 ± 0,6 | 8,2 ± 0,6 | 5,8 ± 1,0 | 5,6 ± 0,5 | 5,4 ± 0,5 |
| *Mannheimia haemolytica* [1, 3,9] | ≤ 0,120 (221) | 9,7 ± 0,9 | 9,3 ± 0,7 | 6,4 ± 0,9 | 6,1 ± 0,6 | 6,0 ± 0,6 |
| *Pasteurella multocida* [1, 5, 9] | ≤ 0,120 (326) | 9,7 ± 0,9 | 9,3 ± 0,7 | 6,4 ± 0,9 | 6,1 ± 0,6 | 6,0 ± 0,6 |
| *Klebsiella pneumoniae* [2] | 0,500 (98) | 7,3 ± 1,4 | 5,5 ± 0,5 | 3,8 ± 0,9 | 3,7 ± 0,5 | 3,4 ± 0,4 |
| *Staphylococcus aureus / intermedius* [8] | 0,500 (11) | 7,3 ± 1,4 | 5,5 ± 0,5 | 3,8 ± 0,9 | 3,7 ± 0,5 | 3,4 ± 0,4 |
| *Arcanobacterium pyogenes* [6] | < 0,125 (22) | 9,7 ± 0,9 | 9,3 ± 0,7 | 6,4 ± 0,9 | 6,1 ± 0,6 | 6,0 ± 0,6 |
| *Clostridium perfringens* [8] | 1,000 (10) | 3,6 ± 0,8 | 3,5 ± 0,5 | 2,5 ± 0,6 | 2,5 ± 0,2 | 2,9 ± 0,4 |

(n): número de cepas testadas. [1]Böttner *et al* (1995), [2]Deshpande *et al* (2000), [3]Katsuda *et al* (2012), [4]Limbert *et al* (1991), [5]Melnikow *et al* (2008), [6]Sheldon *et al* (2004), [7]Thomas *et al* (2004), [8]Thomas *et al* (2006), [9]Wallmann *et al*, (2003).

Tabla 50: Tiempo en horas T > CIM (en leche) calculados para la cefquinoma administrada en forma intramamaria, en las cabras lactantes de la etapa IIIb.

| Microorganismo | $CIM_{90}$ (µg/ml) (n) | T > CIM (h) etapa IIIb |
|---|---|---|
| **ECN [1]** | **0,800 (110)** | **60 ± 11** |
| *Streptococcus* spp [2] | 0,120 (100) | 74 ± 9 |
| *Staphylococcus aureus* [3] | 0,800 (120) | 60 ± 11 |
| *Escherichia coli* [4,5,6,7] | ≤ 0,250 (234) | 66 ± 10 |

[1]Resultados de esta tesis etapa V, [2]Guérin-Faublée *et al* (2002), [3]Russi *et al* (2008), [4]Böttner *et al* (1995), [5]Deshpande *et al* (2000), [6]Sheldon *et al* (2004), [7]Thomas *et al* (2004).

Tabla 51: Intervalos de administración (h) de la cefquinoma a la dosis de 2 mg/kg en las diferentes etapas por las vías intravenosa e intramuscular para las $CIM_{90}$ tenidas en cuenta. Se consideró un T > CIM de al menos un 50 % en el intervalo de dosis.

| | **Vía intravenosa** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $CIM_{90}$ (µg/ml) | **Etapa I (vacías)** | **Etapa IIa (gestantes)** | **Etapa IIIa (lactantes)** | **Etapa IV (cabritos)** | | | | |
| | | | | **3 días** | **10 días** | **24 días** | **50 días** | **80 días** |
| 0,120 | 12 | 16 | 12 | 18 | 18 | 12 | 12 | 12 |
| 0,195 | 12 | 14 | 12 | 16 | 16 | 12 | 12 | 12 |
| 0,250 | 10 | 12 | 10 | 16 | 14 | 10 | 10 | 10 |
| 0,500 | 6 | 8 | 6 | 14 | 10 | 6 | 6 | 6 |
| 0,781 | 4 | 6 | 4 | 9 | 9 | 6 | 6 | 6 |
| 1,000 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 |

| | **Vía intramuscular** | | |
|---|---|---|---|
| $CIM_{90}$ (µg/ml) | **Etapa I (vacías)** | **Etapa IIa (gestantes)** | **Etapa IIIa (lactantes)** |
| 0,120 | 16 | 18 | 16 |
| 0,195 | 14 | 16 | 14 |
| 0,250 | 12 | 15 | 12 |
| 0,500 | 8 | 10 | 8 |
| 0,781 | 6 | 8 | 6 |
| 1,000 | 6 | 6 | 6 |

# *V.- DISCUSIÓN*

# V.- DISCUSIÓN

## V.1.- Discusión del material

Para la selección y manejo del material, se siguieron las recomendaciones que figuran en las siguientes directivas: *Guía para la realización de estudios farmacocinéticos en especies animales* (EMEA/CVMP/133/99 Final), *Guía para la realización de estudios de bioequivalencia de medicamentos veterinarios* (EMEA/CVMP/016/00 corr-Final) y *Guía de seguridad en animales para los productos farmacéuticos veterinarios* (VICH GL 43/2008).

Estos instructivos incluyen, entre otras consideraciones que se tuvieron en cuenta en la metodología, los aspectos relacionados con las características de los animales, contemplando la especie, edad, raza, sexo, estado productivo, así como las condiciones a seguir por los principios de bienestar animal, utilizando el mínimo número de individuos en los ensayos experimentales, según el principio de las “3R” (reducción, reemplazo y refinamiento). También se contemplan los estudios de sanidad de la glándula mamaria y de los animales en los estudios a campo, como los llevados a cabo en esta tesis, así como los aspectos relacionados a las condiciones que se deben seguir para llevar a cabo estudios comparativos de diferentes rutas de administración, de forma que los resultados pudieran ser válidos y ser comparados con otros.

Teniendo en cuenta el esquema de trabajo propuesto en la presente, los animales utilizados en las etapas I a IV pudieron ser seleccionados en lotes homogéneos por tratarse de ensayos experimentales tipo clínico, mientras que los de la etapa V, al tratarse de una investigación del tipo observacional, las variables inherentes a las condiciones del animal y al ambiente donde residían, no pudieron ser controladas, motivo por el cual en este tipo de estudio se empleó un número superior de individuos tal como lo recomiendan Martin *et al* (1997) y Thursfield (2005).

Las características de los animales utilizados en las etapas I a IV fueron similares, según las recomendaciones de las guías mencionadas previamente. Los variables de confusión (Martin *et al*, 1997) fueron controladas al emplear cabras de la misma raza, sexo, intervalo etario, clínicamente sanas y criadas bajo las mismas condiciones, en la unidad experimental de la Universidad Católica de Córdoba. Esta unidad experimental está ubicada en el predio del Hospital Veterinario de dicha Universidad, teniendo los animales control permanente de su estado sanitario. Por tanto todas las cabras poseían su historia clínica registrada, con las desparasitaciones y vacunaciones correspondientes así como los antecedentes de medicación, los cuales nos fueron de utilidad al momento de seleccionar los individuos para evitar las posibles interacciones farmacológicas con nuestros ensayos.

Se escogió a la raza Anglo Nubian por ser una de las utilizadas en la región. A excepción de la etapa IV, por las propias características del ensayo, todos los animales fueron hembras con una edad comprendida entre los 2 y 5 años, y un peso promedio de 50 ± 5 kg. El estado sanitario de glándula mamaria y la producción de leche se tuvieron en cuenta en aquellos individuos que participaban en las etapas relacionadas a la lactación. Estos indicadores relacionados al animal se deben contemplar por la interferencia con los estudios farmacocinéticos, tal como lo sugiere la bibliografía (Shoaf *et al*, 1989; Clarke *et al*, 1992; Golenz *et al*, 1994; Kinoshita *et al*, 1995; Brown *et al*, 1996; Lees y Shojaee Aliabadi, 2002; Waxman *et al*, 2004; Ismail, 2005; Bajwa *et al*, 2007; Marín *et al*, 2007; Baroni *et al*, 2008; Stockler *et al*, 2009; Cagnardi *et al*, 2010; Idowu *et al*, 2010; Lucas *et al*, 2010; Doré *et al*, 2011; Zonca *et al*, 2011).

Puesto que al principio de la experimentación cabía la posibilidad de que alguno de los animales fallara, se pensó en comenzar con un número mayor de 6, pero que con el principio de no utilizar más animales de los necesarios, se optó por sustituir aquellos que se retiraban de la prueba por cuestiones diversas (tabla 52); esto se tradujo en la necesidad de no poder hacer análisis estadísticos de muestras pareadas en estos casos.

La descripción de las etapas (I a IV) en este trabajo sigue un orden “natural” (vacías, gestantes, lactantes y edades de los cabritos). Sin embargo la cronología real de los ensayos (tabla 52) fue diferente a esta descripción debido, a la combinación de factores fisiológicos y productivos, junto con el momento en que se disponía del preparado comercial (Cobactan®) ya que en Argentina no es comercializado y se debía esperar a que llegara el producto desde Europa.

Tabla 52: Orden real en la realización de los ensayos con cefquinoma, y animales intervinientes en cada etapa.

| **Cronología real de los ensayos** | Identificación de los animales | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **IIIb** | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | | | | | |
| **I** | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | | | | | |
| **IIa** | ● | ● | | ● | ● | ● | ● | | | | | |
| **IIb** | ● | ● | | | | ● | | ● | ● | ● | | |
| **IIIa** | | | | ● | ● | | ● | ● | | | ● | ● |

En el caso de los animales de la etapa V, y por tratarse de un muestreo correspondiente a un estudio de observación, el criterio de selección de los individuos fue aleatorio teniendo en cuenta un número mínimo que sea representativo de la cantidad de individuos en la población (Vivanco, 2005). Si bien la época natural de leche en la región objeto de estudio, está comprendida entre mediados de noviembre hacia fines de marzo, se realizó

el muestreo entre diciembre a febrero, pues es la época donde hay mayor producción láctea y la probabilidad de encontrar ECN en leche se incrementa con el nivel de producción (Corrales *et al*, 1997; Bergonier *et al*, 2003). La distribución espacial de los tambos fue tenida en cuenta en el muestreo en esta etapa, de modo que las conclusiones referidas a prevalencia y CIM de cefquinoma a ECN fueran representativas de la región objeto de estudio (Thursfield, 2005; Vivanco, 2005). En algunos casos, los propietarios de los tambos eran reacios a participar del estudio, por lo que hubo zonas que quedaron sin muestrear.

En lo referente al material farmacológico empleado, especialmente de CFQ, se siguieron las instrucciones que el laboratorio elaborador del producto recomienda para su almacenamiento y manipulación.

En cuanto al equipamiento utilizado para la detección y procesado de las muestras, periódicamente se realizaron controles de mantenimiento, calibrado y limpieza según las recomendaciones de diferentes instructivos que se basan en las “Buenas Prácticas de Laboratorio” (GLP: DEPC 2004/9/EC 11; GCP: CVMP/VICH/595/98-FINAL, VICH 1998a).

De esta manera se intentó asegurar la máxima calidad de los productos utilizados y del material empleado.

## V.2.- Discusión del método

### V.2.1.- Elección de la dosis y vías de administración

Las dosis de CFQ en las diferentes fuentes bibliográficas son variables, según la especie empleada, vía de administración y objetivos planteados. Las dosis en dichos trabajos, en general, son de 1 o 2 mg/kg tanto por la vía IV como la IM en cerdos (Block *et al*, 2005; Li *et al*, 2008), cabras (Errecalde *et al*, 2001), ovejas (Tohamy, 2011), terneros (Errecalde *et al*, 2002), caballos (Winther *et al*, 2011), camellos (Al-Taher, 2010) y pollos (El-Gendy *et al*, 2009), e inclusive Limbert *et al* (1991) emplearon 5, 10 y 20 mg/kg en perros, cerdos o vacas por las vías IV, IM o SC. Es de destacar que pese a la variación de dosis, en ninguno de los trabajos citados se informaron efectos adversos.

En nuestro caso hemos utilizado una dosis de 2 mg/kg para las vías IV e IM, las cuales son suficientes para asegurar las concentraciones plasmáticas durante un período de tiempo adecuado (de al menos tres semividas) fundamentalmente para poder definir los procesos de eliminación, tal como lo recomiendan las normativas de regulación de medicamentos en la Unión Europea (EudraLex Volume 8, 2005).

La vía de administración IV si bien no es la que normalmente se utiliza a campo para el tratamiento de infecciones, es la indicada para definir el comportamiento cinético de los fármacos y poder establecer la biodisponibilidad absoluta a partir de otras vías.

La administración IM se escogió porque el preparado comercial está diseñado para tal fin y es una de las vías recomendadas para CFQ. Se inyectó entre los músculos semitendinoso y semimembranoso en único punto, ya que en ningún momento se superó el volumen total de 5 ml.

El producto IMM está formulado para la especie bovina y la dosis que recomienda el laboratorio es de 75 mg por cuarto mamario. No existen dosis de referencia para la especie caprina. La dosis adoptada en este caso (10 mg por medio mamario), surgió por extrapolación, teniendo en cuenta que una vaca promedio produce entre 5 a 7 litros por cuarto mamario y la cabra tan sólo 0,5 a 1 litros por medio.

### V.2.2.- Metodología analítica

Existen diversas técnicas analíticas para detectar y cuantificar un betalactámico en suero, leche u otras matrices, siendo las más frecuentes para estudios farmacocinéticos la cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* o HPLC) y la microbiológica de difusión en agar, existiendo en general una buena correlación entre los resultados de ambas metodologías (Arcellonia *et al*, 1996; Da Silveira y Schapoval, 2002; Guerra *et al*, 2005; Mendez *et al*, 2005; Souza *et al*, 2006; Bergold, 2007; Schmidt *et al*, 2009). Sin embargo con la técnica microbiológica sólo se logra caracterizar la actividad antimicrobiana y no el compuesto *per se*, especialmente si tiene metabolitos activos; sobreestimando ocasionalmente el valor de algunos parámetros farmacocinéticos (Cester *et al*, 1996; McKellar *et al*, 1999).

Las técnicas en las que nos hemos basado para la detección y cuantificación de CFQ con equipo HPLC, están descriptas por Sørensen y Snor (2000), Suhren y Knappstein (2003) y Li *et al* (2008) quienes trabajaron con leche y/o suero, e incluso por la descripta por Zhang *et al* (2007) quienes trabajaron con músculo, grasa, hígado y riñón porcino. Estas mismas técnicas además han sido utilizadas por Winther *et al* (2011), Cagnardi *et al* (2010) y Zonca *et al* (2011).

Todas ellas, al igual que la elegida por nosotros, utilizan un HPLC acoplado a un detector con luz ultravioleta (UV), debido a que las cefalosporinas son compuestos con alta absorbancia en el espectro UV (Gallo Martínez *et al*, 2002). Cabe aclarar que existen técnicas donde la detección de CFQ es realizada mediante espectrometría de masas

(Maes *et al*, 2007) la cual disminuye sensiblemente el límite de cuantificación. Sin embargo, esta técnica no está tan difundida como el HPLC con detector UV debido a su costo, y porque la sensibilidad de este último método es adecuado para la realización de estudios farmacocinéticos.

Tanto el equipo, las columnas y las condiciones cromatográficas que empleamos son similares a los trabajos citados previamente. Mientras que nosotros hemos utilizado una longitud de onda para la detección UV de 267 nm, una temperatura de la columna de 36 °C , flujo de 2 ml/min y un volumen de inyección de la muestra de 20 µl, el resto de los trabajos emplearon una longitud de onda entre 265 a 270 nm, la columna a 20, 24, 30 o 45 °C según el caso, un flujo de 0,5 a 1 ml/min y volumen de inyección entre 20 y 100 µl. Nuestro tiempo medio de retención de 7 minutos fue similar al descripto por Zhang *et al* (2007); Li *et al* (2008); Winther *et al* (2011) y Zonca *et al* (2011) y diferente a los 15 minutos de Suhren y Knappstein (2003) y 30 minutos de Sørensen y Snor (2000).

Las técnicas extractivas empleadas son diferentes en todos los casos, dependiendo si la matriz es leche, suero o incluso músculo, grasa, hígado y riñón en el caso de Zhang *et al* (2007). Las fases móviles son en general combinaciones en distintas proporciones de agua y acetonitrilo (a veces metanol) con soluciones amortiguadoras tales como fosfato de tetraetilamonio (0,1 M; pH 5), ácido octanosulfónico (0,005 M; pH 2,52) o ácido fosfórico (0,085 M; pH 2,8).

A diferencia de las extracciones empleadas en dichos trabajos, no empleamos cartuchos de extracción en fase sólida ni tampoco hemos desecado y reconstituido el extracto, previo a su inyección en el HPLC.

Presentamos límites de detección y cuantificación (0,018 y 0,037 µg/ml, respectivamente) superiores a los descriptos por estos trabajos (con límites de detección entre 0,001 y 0,010 µg/ml, y de cuantificación generalmente de 0,010 µg/ml), aunque suficientes para los objetivos que nos hemos planteado en esta tesis. Sin embargo, la validación que hemos realizado presenta similares características de en cuanto a la linealidad, precisión, exactitud y recuperación, y acorde a lo exigido por las normativas de validación GL 2, del programa VICH (1998b) mencionados en materiales y métodos, así como también, con los incluidos recientemente en los *Procedimientos de validación para métodos bioanalíticos*, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, de la Agencia Europea del Medicamento (2009).

Por último, las concentraciones de CFQ cuantificadas en líquido amniótico y cotiledón placentario, fueron determinadas por extrapolación directa desde la curva de calibrado realizada en suero. Si bien, lo ideal es realizar esta curva para cada matriz en particular (McDowall, 2005), es de destacar que al no ser frecuente la realización de operaciones

cesáreas en caprinos, considerábamos innecesario el someter a un animal a ese procedimiento, cuando los resultados del estudio no justifican el empleo de mas individuos (uso mínimo de animales según los principios de bienestar animal). Además, la composición del líquido amniótico, si bien va variando conforme el feto se desarrolla, se puede considerar parecida a la de suero sanguíneo (Brace, 1995; Gómez Ruiz y Montalvo Montes, 2006) y por lo tanto podemos realizar el cálculo de las concentraciones en esta matriz por extrapolación directa, tal como lo realizaron Lima *et al* (2005).

### V.2.3.- Metodología experimental

En las etapas donde hubo intervención experimental sobre los animales (I a IV), se respetaron las normativas recomendadas por las guías descriptas previamente (EMEA/CVMP/133/99 Final; EMEA/CVMP/016/00 corr-Final; VICH GL 43/2008).

En cada una de ellas, y a excepción de la etapa IV por las propias características del ensayo, se realizaron diseños experimentales cruzados entre las vías IV e IM con períodos de lavado no inferior a los 15 días.

Como se mencionó previamente y según se observa en la tabla 52, se comenzó con la vía IMM debido a que los animales en ese momento estaban en fase de lactación (la cual es estacional) y cumplían con los requisitos exigidos para el ensayo.

La etapa V, al no existir experimentación en los animales intervinientes, estuvo relacionada más con una investigación epidemiológica observacional tipo encuesta transversal, siguiéndose las recomendaciones para el muestreo propuestas por Martin *et al* (1997) y Thursfield (2005).

## V.3.- Discusión por etapas experimentales

### V.3.1.- Elección del modelo farmacocinético

El tratamiento de los datos de las diferentes concentraciones séricas o de leche, requería un modelo que permitiera la comparación en condiciones de igualdad para los diferentes individuos, estados fisiológicos y vías de administración, más aún teniendo en cuenta que en nuestro estudio se realizaron cuarenta y ocho análisis farmacocinéticos para la vía IV, dieciocho para la vía IM y seis para la IMM. Este fue el principal motivo por el que se escogió el modelo no compartimental, debido a que es independiente del efecto de estas variables, y a su vez los parámetros lo son respecto al número de compartimientos que se pudieran escoger en cada análisis (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, 2009).

Este modelo describe el comportamiento del fármaco basándose en el tiempo promedio que una molécula permanece en un espacio cinéticamente homogéneo, un concepto idéntico a un compartimiento farmacocinético; más aún, en teoría, cualquier análisis "no compartimental" tiene un equivalente compartimental. Los datos que se analizan son típicamente perfiles de concentración séricas en el tiempo, lo que implica que al menos una estructura (central) del modelo compartimental existe, pues simplemente no hay manera de evitar ese supuesto (Riviere, 2011).

La diferencia con el modelo compartimental es que no se realiza ninguna inferencia específica sobre las características y estructura de esos espacios. De esta manera, al no existir los compartimientos no se los relaciona con alguna estructura anatómica en particular (tejidos u órganos) (Riviere, 2011).

Otra diferencia importante es que en vez de determinar las tasas de cambio en función de constantes de difusión o eliminación y semividas, los modelos no compartimentales describen los procesos farmacocinéticos en términos de momentos estadísticos. De esta manera las curvas de concentración plasmática frente al tiempo, se tratan como si fueran curvas de distribución estadísticas. En lugar de basarse en constantes de difusión entre compartimientos, los modelos no compartimentales se encuentran basados en funciones de densidad de probabilidad, las cuales definen el comportamiento del fármaco en términos de la probabilidad de que el mismo se encuentre en una localización en particular. Además se emplean ecuaciones integrales en vez de diferenciales, por lo que la metodología de cálculo es más sencilla (Riviere, 2011; Kinabo y McKellar, 1989).

Por otro lado, el grado de simplificación del modelo no compartimental, va en detrimento de la posibilidad de explicar ciertas actuaciones meramente farmacocinéticas, pues al no existir concepto de compartimiento, no existen las constantes de transferencia de fármacos entre los mismos ($k_{10}$, $k_{12}$, $k_{21}$ para modelos bicompartimentales, e inclusive $k_{13}$ y $k_{31}$ para los tricompartimentales), así como tampoco las constantes asociadas a la distribución y eliminación (α y β, respectivamente) ni su respectivas semividas (T½α y T½β, respectivamente). De todas formas aunque estos parámetros son de utilidad para explicar un comportamiento cinético más detallado, los parámetros del modelo no compartimental son suficientes como para dar respuestas a la gran mayoría del comportamiento cinético de los fármacos en el organismo especialmente los de mayor relevancia clínica.

### V.3.2.- Etapa I: farmacocinética en cabras adultas no lactantes ni gestantes

Administración intravenosa

Según se puede ver en la figura 17 y la tabla 20, luego de la administración IV de CFQ en las cabras, los valores de concentración de CFQ descienden rápidamente desde su administración hasta las 0,33 horas y luego las concentraciones decaen más lentamente desde la media hora hasta el final. En la figura 44 se puede observar este efecto en una escala semilogarítmica. Este fenómeno, que se repite en las etapas II, III y IV, como en la mayoría de los fármacos, responde a un proceso farmacocinético de primer orden, donde cada intervalo fijo de tiempo, se distribuyen o eliminan, proporciones constantes de moléculas (Riviere, 2009).

Este hecho responde a la ley de Fick donde la tasa de difusión de un compuesto a través de una membrana es directamente proporcional a su gradiente de concentración, su coeficiente de partición lípido/agua y su coeficiente de difusión (Riviere, 2011).

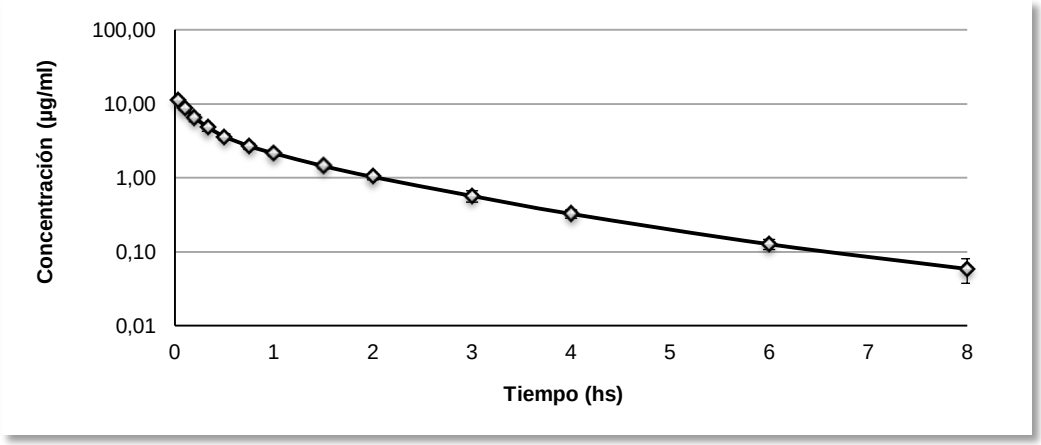



Figura 44: Representación de la evolución temporal de las concentraciones de cefquinoma en la etapa I por vía IV, en escala semilogarítmica.

El rápido descenso de las concentraciones séricas de CFQ repercute (entre otros procesos) en el volumen de distribución, tanto durante el estado de equilibrio ($Vd_{ss}$ = 377,35 ± 37,75 ml/kg) como durante el pseudoequilibrio ($Vd_{área}$ = 578,38 ± 141,22 ml/kg). Estos valores son similares a los informados para otros estudios farmacocinéticos realizados con diferentes cefalosporinas (tabla 53).

Si se comparan estos Vd con otros fármacos (ej. tilosina IV en cabras con un Vd 1700 ml/kg; Atef *et al*, 1991) se podrá apreciar una notable diferencia, infiriendo que la distribución es mayor en macrólidos que en cefalosporinas y, si bien esto es cierto hay que realizar algunas aclaraciones. En primer lugar, un valor bajo de Vd no necesariamente

indica que el fármaco alcance con dificultad espacios extravasculares; por otra parte, si bien este parámetro no fue concebido para estimar la magnitud de los procesos de distribución de un fármaco en el organismo, se le puede dar una interpretación fisiológica (particularmente al $Vd_{ss}$), si se tiene en cuenta el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004d).

Tabla 53: Volúmenes de distribución en cefquinoma y otras cefalosporinas administradas a diferentes especies animales por vía intravenosa (IV).

| Cefalosporina | Especie | Dosis IV (mg/kg) | UPP (%) | $Vd_{ss}$ (ml/kg) | $Vd_{area}$ (ml/kg) | Autor |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cefquinoma | Caballo | 1 | 20 - 30 | 210 | - | Winther *et al*, 2011 |
| Cefquinoma | Cerdo | 10 | <10 | 240 | - | Limbert *et al*, 1991 |
| Cefquinoma | Perro | 10 | <10 | 240 | - | Limbert *et al*, 1991 |
| Cefadroxilio | Caballo | 5 | - | 374 | 526 | Duffee *et al*, 1997 |
| Cefalexina | Caballo | 10 | 15 - 30 | 250 | 600 | Davis *et al*, 2005 |
| Cefazolina | Cabra | 10 | - | - | 447 | Ahuja *et al*, 2009 |
| Cefpiroma | Búfalo | 10 | - | 400 | 420 | Rajput *et al*, 2007 |
| Ceftriaxona | Cabra | 20 | 39 - 45 | 370 | - | Ismail, 2005 |
| Cefuroxima | Caprino | 40 | 13 - 22 | 460 | 617 | El-Sooud *et al*, 2000 |

UPP: proporción de fármaco unido a proteínas plasmáticas; $Vd_{ss}$ y $Vd_{área}$: volumen aparente de distribución en el estado estacionario y calculado por el método del área, respectivamente.

Estudios de ATMs en perros han demostrado que la unión a las proteínas plasmáticas es el principal determinante de las concentraciones extracelulares (Bidgood y Papich, 2002). La CFQ se une en un 5 a 15 % a las proteínas plasmáticas en bovinos, caninos, porcinos y ovinos (Limert *et al*, 1991; EMEA, 1995; Tohamy, 2011) y en un 20 – 30 % en equinos (Winther *et al*, 2011); este bajo porcentaje de unión a proteínas del plasma permite establecer un rápido equilibrio entre las concentraciones de la sangre y los líquidos extravasculares, fundamentalmente a nivel del intersticio.

Esto fue comprobado en el estudio que realizaron Davis *et al* (2005) con cefalexina en caballos donde, pese al escaso $Vd_{ss}$ (250 ml/kg), pudieron evidenciar que el fármaco se acumulaba en una elevada proporción en el fluido intersticial (> 80 %), y una de las razones principales de este resultado fue la elevada fracción de cefalexina libre (no unida a proteínas plasmáticas) encontrada (77 %).

Esta característica es importante desde un punto de vista de eficacia clínica ya que si bien las cefalosporinas no se concentran intracelularmente (Brown y Percival, 1978), son numerosas las infecciones bacterianas que asientan en el medio extracelular.

La mayor proporción de paso de la CFQ libre desde la sangre hacia el intersticio, probablemente sea a través de espacios generados entre las células del endotelio capilar

o de los poros presentes en el mismo (dependiendo del tipo de capilares, ya sea fenestrado, contínuo o sinusoidal), puesto a que existen otros factores, además de la unión a proteínas sanguíneas, que condicionan la tasa de difusión de un fármaco a través de la membrana. Entre las que se citan en general en la bibliografía (Riviere, 2009), como las más influyentes, se encuentran el tamaño de la molécula, la solubilidad en membranas y el grado de ionización. Teniendo en cuenta que la CFQ es una molécula hidrofílica que posee un pKa de 2,71 y al interactuar con el plasma cuyo pH es de 7,4, según la aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, genera un cambio en el equilibrio existente entre las formas no ionizadas e ionizadas a favor de esta última. Por lo tanto en este medio predomina la forma polar de CFQ y sumado a su característica hidrófila, dificulta su paso a través de la porción fosfolipídica de las membranas celulares, lo que explicaría por qué la CFQ no puede difundir más allá del intersticio.

En cuanto a los parámetros que caracterizan a los procesos de eliminación de las drogas (Cl, $T½λ_e$ y TMR) los resultados obtenidos en este trabajo muestran una rápida desaparición de la CFQ del organismo.

El Cl total calculado (250,54 ± 19,31 ml·kg/h) es más alto que la tasa de filtrado glomerular en cabras (168 ml·kg/h; Smith y Sherman, 2009). Como la CFQ es fundamentalmente eliminada por los riñones sin metabolización previa, estos datos sugieren que tanto la filtración como la secreción tubular intervienen en la excreción renal. Este valor, se asemeja al Cl de otras cefalosporinas estudiadas en caprinos (tabla 54) y es superior al de CFQ en distintas especies animales (tabla 55).

Es importante dejar ver que al igual que la CFQ, otras cefalosporinas poseen un Cl mayor en el caprino respecto a otras especies animales. Así por ejemplo para la cefalexina se registró un Cl de 350, 150 y 180 ml·kg/h para caprinos (Ambros *et al*, 2011), perros (Carli *et al*, 1999) y bovinos (Villa *et al*, 2001), respectivamente. Para la cefotaxima se informaron valores de Cl de 416 ml·kg/h en cabras (Atef *et al*, 1990) y de 168 ml·kg/h en gatos (McElroy *et al*, 1986); mientras que para la ceftriaxona, si bien los valores de Cl son similares, siguen siendo superiores en caprinos (237 ml·kg/h; Ismail, 2005) que los registrados en ovinos (222 ml·kg/h; Guerrini *et al*, 1985) o en bovinos (203,4 ml·kg/h; Soback y Ziv,1988). Esto puede ser debido en parte al metabolismo hepático que puedan tener las diferentes moléculas y / o a la participación eficiente de los procesos de excreción renal en caprinos, tal como se describe posteriormente. Estas diferencias justifican la necesidad de estudios farmacocinéticos en la especie caprina, pues la falta de estudios cinéticos específicos de ATMs (y fármacos en general) en dicha especie,

conlleva a extrapolaciones de esquemas de dosificación erróneos, que pueden traducirse en fallos terapéuticos, efectos tóxicos o aparición de cepas bacterianas resistentes.

Tabla 54: Valores de semivida de eliminación ($T½λ_e$), tiempo medio de residencia (TMR y aclaramiento plasmático (Cl) de cefalosporinas administradas por vía IV en caprinos.

| Cefalosporina | Dosis IV (mg/kg) | $T½λ_e$ (h) | TMR (h) | Cl (ml·kg/h) | Autor |
|---|---|---|---|---|---|
| Cefazolina | 10 | 1,80 | - | 201,60 | Ahuja *et al*, 2009 |
| Cefaloridina | 30 | 0,79 | - | 313,80 | Roy *et al*, 1997 |
| Ceftriaxona | 20 | 1,44 | 1,56 | 237,00 | Ismail, 2005 |
| Cefuroxima | 20 | 1,48 | 1,82 | 370,92 | El-Sooud *et al*, 2000 |
| Cefuroxima | 40 | 1,42 | 1,52 | 302,34 | El-Sooud *et al*, 2000 |

Tabla 55: Valores de semivida de eliminación ($T½λ_e$) y aclaramiento plasmático (Cl) de cefquinoma administrada por vía IV en distintas especies.

| Especie | Dosis IV (mg/kg) | $T½λ_e$ (h) | Cl (ml·kg/h) | Autor |
|---|---|---|---|---|
| Caballo | 1 | 2,77 | 120,00 | Winther *et al*, 2011 |
| Cerdo | 10 | 1,23 | 160,00 | Limbert *et al*, 1991 |
| Perro | 10 | 0,98 | 216,27 | Limbert *et al*, 1991 |
| Ternero * | 10 | 1,33 | 132,71 | Limbert *et al*, 1991 |

(*) Terneros de ambos sexos de 140 kg.

Si bien los Cl de otras cefalosporinas reflejados en la tabla 54 son semejantes al obtenido por nosotros para la CFQ, es lógico que existan diferencias consecuencia de las particularidades físico-químicas de cada molécula como son el peso molecular, la hidrofilicidad, la cuantía de unión a las proteínas plasmáticas y su pKa. Todas estas características, influyen en el filtrado glomerular, secreción y reabsorción tubular y por lo tanto en el aclaramiento renal y a su vez en el Cl total corporal. Como se comentó anteriormente, en la difusión de las moléculas a través de una membrana referido a la relación entre el pKa y el pH, el pKa ácido de CFQ condiciona su rápida excreción renal en una orina alcalina, típica de los caprinos y rumiantes en general, con valores de pH entre 7,2 a 8 (Smith y Sherman, 2009), ya que en este medio predominará la forma ionizada y consecuentemente se evitará que sea reabsorbida.

Además, en el caso de los datos de Cl en la tabla 55, la diferencia se incrementa por tratarse de diferentes especies animales. Relacionado a esto, es importante destacar que, desde un punto de vista fisiológico, el Cl está influido directamente por dos factores: el flujo sanguíneo (o gasto cardíaco) y el coeficiente de extracción (Tozer y Rowland, 2006). El flujo sanguíneo (Q) afecta principalmente a los órganos de eliminación y está relacionado al peso corporal (P) según la ecuación alométrica $Q = 180 \times P^{-0,19}$, expresado P en kg y Q en ml·kg/min (Toutain y Bousquet Melou, 2004b). En el caso de las cabras de

la etapa I con un peso medio de 48 kg, el valor de Q sería de 86,27 ml·kg/min, mientras que, de acuerdo a los pesos de los animales intervinientes en los trabajos referidos en la tabla 55, los valores aproximados de Q serían de 54, 104, 100 y 70 ml·kg/min para caballos, cerdos, perros y terneros, respectivamente. Por lo tanto, éste sería uno de los factores que estableciera la diferencia en el aclaramiento de la CFQ en las diferentes especies.

El otro factor que influye en el Cl, el coeficiente de extracción (E), es la capacidad que tiene un órgano (o los órganos que intervienen en el aclaramiento total) de retirar de la circulación un fármaco durante un único paso a través del mismo, y se puede determinar a través de la relación $(C_{in} – C_{out})/C_{in}$, siendo $C_{in}$ y $C_{out}$ las concentraciones del fármaco que ingresan y egresan, respectivamente, en un único paso a través de los órganos que participan en la eliminación.

Por lo dicho anteriormente, el Cl sería el equivalente del múltiplo entre Q y E (Cl = Q x E), y podemos calcular el valor de E para la CFQ en cabras (y por ende la magnitud de la extracción) conociendo Cl y Q; pero para que este cálculo se ajuste lo más posible a la realidad es necesario hacer unas consideraciones previas.

Es sabido que Cl total corporal es la suma de los Cl individuales de los órganos que participan en la eliminación, mayormente el hígado y el riñón. En el caso particular de la CFQ el Cl es casi puramente renal ($Cl_R$), por lo tanto $Cl_R = Q_R \times E_R$. Según nuestros resultados, el Cl de las cabras de la etapa I es de 250,54 ml·kg/h (o 4,18 expresado en ml·kg/min) y corresponden al Cl total que es igual a $Cl_R$. Por otra parte, si se tiene en cuenta que el 20 % del flujo sanguíneo es el que llega al riñón (Toutain y Bousquet Melou, 2004b), el valor de $Q_R$ es de 17,25 ml·kg/min (20% de 86,27 ml·kg/min). Por lo tanto el valor de E (o $E_R$) para las cabras de la etapa I es de 0,24 (4,18 / 17,25).

Para saber si nuestro valor calculado de E corresponde a una extracción alta o baja, tendríamos que basarnos en los puntos de corte que se encuentran en la bibliografía. Según Tozer y Rowland (2006) se considera una baja, mediana y alta extracción, cuando E toma valores de inferiores o iguales a 0,1, alrededor de 0,3 y superiores o iguales a 0,7 respectivamente. Por otra parte Toutain y Bousquet Melou (2004b) modifican estos valores considerando que el hígado y el riñón son los principales órganos que participan en el Cl total corporal; por lo tanto y, teniendo en cuenta que el flujo sanguíneo que llega a estos órganos es del 50 % (riñón 20 %, e hígado 30 %), los respectivos valores de E ahora serían de 0,05 (el 50 % de 0,1), 0,15 (el 50 % de 0,3) y 0,35 (el 50 % de 0,7). Con este mismo razonamiento, si consideramos para el caso de la CFQ la eliminación renal, se debería contemplar sólo el 20 % del flujo sanguíneo que llega al riñón. Por lo tanto, ahora

los valores de E para indicar si la extracción es baja, mediana o alta serían de 0,02 (el 20 % de 0,1), 0,06 (el 20 % de 0,3) y 0,14 (el 20 % de 0,7), respectivamente. Concluyentemente, nuestro E calculado (0,24) indicaría que la CFQ en cabras pose una elevada extracción renal (o corporal).

A diferencia de lo que sucede con otras moléculas que sufren un fenómenos de primer paso hepático (Crisman *et al*, 1993; Marroum *et al* 1994; Bonnin *et al*, 1999) y presentan elevados valores de extracción, la alta cantidad de CFQ encontrada en orina en forma inalterada (EMEA, 1995) descartan esta posibilidad, y que por otro lado requeriría valores de E próximos a la unidad.

Los otros parámetros que caracterizan la eliminación (la $T½\lambda_e$ = 1,61 ± 0,41 h, y el TMR =1,51 ± 0,15 h) también son semejantes al de otras cefalosporinas en cabras (tabla 54). Sin embargo, al comparar la $T½\lambda_e$ con la obtenida para CFQ en otras especies (tabla 55) se pueden apreciar diferencias. Esto se debería a la naturaleza híbrida de este parámetro, pues está afectado por el Vd y el Cl (Toutain y Bousquet Melou, 2004c). Desde el punto de vista fisiológico este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que cuanto más se distribuya un fármaco a sitios extravasculares o bien cuanto menor sea su Cl, más tiempo permanecerá en el organismo. Matemáticamente esto se explica por la ecuación $T½\lambda_e$ = (0,693 x $Vd_{área}$) / Cl. En los trabajos citados de la tabla 55, no se disponen de datos del TMR, probablemente por tratarse de análisis compartimentales (aunque se debe aclarar que algunos trabajos que emplean modelos compartimentales calculan el TMR en forma independiente; como en el caso de Albarellos *et al*, 2007). Sin embargo, es un parámetro que no se ve tan influenciado por el Cl y el Vd, porque es calculado por la relación entre el ABC y el área bajo el momento estadístico de la curva (ABMC), por lo tanto no considera el tiempo medio durante la fase exclusiva de eliminación (como la $T½\lambda_e$), sino una estimación de lo que dura en total el fármaco en el organismo. Es de esperarse entonces, valores de TMR proporcionales a estas variables.

La cantidad de fármaco en el organismo se puede conocer por medio del ABC, que en nuestro caso toma valores de 8,02 ± 0,63 µg·h/ml y de 7,91 ± 0,61 µg·h/ml, para el ABC∞ y $ABC_{0-t}$, respectivamente. Tanto en esta etapa experimental como en las demás, estos dos valores son semejantes (en general la diferencia es inferior al 5 %), por lo tanto de ahora en más siempre que nos refiramos al ABC, será por defecto el ABC∞, ya que es más representativo y no afecta la interpretación del valor del $ABC_{0-t}$ cuando la porción extrapolada al infinito es inferior al 20 % de éste último (Riviere, 2009).

Limbert *et al* (1991) publicaron los valores de ABC para CFQ a la dosis de 10 mg/kg IV en bovinos de 140 kg (84,70 µg·h/ml), cerdos (62,30 µg·h/ml) y perros (50,40 µg·h/ml). Para

poder comparar estas ABC con el valor medio de las cabras del presente trabajo, deberíamos emplear la misma dosis. Si en vez haber utilizado 2 mg/kg hubiésemos administrado 10 mg/kg, considerando un comportamiento lineal de esta molécula, nuestro valor de ABC habría sido cinco veces superior, es decir 40,1 µg·h/ml. Este nuevo valor de ABC, continúa siendo inferior a los correspondientes calculados Limbert *et al* (1991) para cada especie. Si se tiene en cuenta que la relación ABC = dosis / Cl (Riviere, 2009) a igualdad de dosis, estaríamos en condiciones de decir que el menor valor del ABC en las cabras tiene que ver con un mayor Cl (250,54 ml·kg/h) en esta especie respecto al de los bovinos, cerdos y perros (132,71; 160,00 y 216,27 ml·kg/h, respectivamente, tabla 55). Esto también se puede ver en el trabajo de Winter *et al* (2011) quienes obtuvieron un ABC en equinos de 8,33 µg·h/ml administrando 1 mg/kg de CFQ IV, valor casi igual al obtenido en nuestro trabajo, considerando que se le administraron a los caballos la mitad de la dosis que le administramos a las cabras; esto es debido al efecto del Cl, que es el doble en las cabras respecto a los caballos de dicho trabajo.

Administración intramuscular

En cuanto a la farmacocinética de la CFQ tras la administración IM en los animales de la etapa I, se puede observar en la figura 17 y tabla 20 cómo los valores de concentraciones séricas se incrementan rápidamente desde la administración hasta la primera hora con un valor medio de $C_{max}$ de 2,43 ± 0,31 µg/ml.

En las cabras de la etapa I, la biodisponibilidad (F) toma dimensiones muy elevadas en la mayoría de ellas (94,02 ± 1,37 %). Por el momento, gran parte de las investigaciones publicadas con CFQ para la vía IM en distintas especies, lo han hecho sin contemplar la vía IV, por lo tanto no está disponible el valor de F, pudiendo realizarse comparaciones con este parámetro en sólo dos publicaciones. Por un lado, Li *et al* (2008), administraron CFQ en cerdos jóvenes por vías IV e IM y obtuvieron una F del 95 %, similar a la obtenida en este trabajo de tesis, pero por otra parte Block *et al* (2005) informan una F del 32 al 44 % con CFQ en cerdas gestantes y lactantes. Las diferencias que se observan con este último estudio pueden ser debidas a varias causas. Teniendo en cuenta que el valor medio del ABC de la vía IM (a la dosis de 2 mg/kg) en las cerdas con gestaciones tempranas (seis semanas promedio) es similar que el de las cabras de la etapa I vía IM, la diferencia en el cálculo de F, estaría en las ABC de las vías IV y en las dosis empleadas en las mismas; el ABC IV es casi el doble en las cerdas preñadas (con 1 mg/kg IV) respecto a las cabras de la etapa I (con 2 mg/Kg IV). Esta diferencia puede ser debida al estado de gestación (que se tratará más adelante), a los intervalos de muestreo

empleados (Block *et al*, 2005, muestrean inicialmente a los 5, 20, 40 y 60 minutos pudiendo sobreestimar el cálculo trapezoidal del ABC IV), o bien a los distintos métodos de detección y cuantificación. Otra diferencia podría ser debida a los diseños experimentales; mientras que en nuestro trabajo utilizamos un diseño cruzado entre las vías IV e IM, Block *et al* (2005) administraron CFQ a las seis cerdas por vía IV y cinco días más tarde, todas ellas recibieron CFQ vía IM. Este tipo de diseño tiende a subestimar (o sobreestimar) el cálculo de la biodisponibilidad en la mayoría de los casos (EMEA, 2000; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a).

Además, los valores de F para la vía IM en cabras, determinados en otras cefalosporinas como cefepima (Prawez *et al*, 2010), cefotaxima (Atef *et al*, 1990), ceftriaxona (Ismail, 2005) y cefuroxima (El-Sooud *et al*, 2000) son superiores al 85 % en todos los casos.

Por otra parte en los animales de la etapa I, se puede observar una rápida desaparición del fármaco desde el sitio de administración en los seis animales, con valores de semivida de absorción ($T½\lambda_a$) que oscilan entre las 0,18 y 0,45 h (media 0,35 ± 0,10 h), similar al descripto por Errecalde *et al* (2001) con una media de 0,28 h para dicho parámetro, administrando CFQ a la dosis de 1 mg/kg IM también en la especie caprina. Otros datos similares de $T½\lambda_a$ se han registrado en cerdos jóvenes (Li *et al*, 2008) y terneros (Errecalde *et al*, 2002) con valores de 0,41 y 0,57 h, respectivamente. Tohamy (2011) por su parte administró 1 y 10 mg/kg IM de CFQ en ovejas de un año de edad, obteniendo una $T½\lambda_a$ de 0,66 y 1,60 h, respectivamente, proporcionales a la dosis administrada. Un valor muy superior (4,35 h) fue reportado en camellos administrando 1 mg/kg IM (Al-Taher, 2010); es posible que este valor tome estas dimensiones debido al intervalo de muestreo amplio que se ha tomado, así como, posiblemente, la elección de los puntos de ajuste en el programa farmacocinético empleado. El valor más bajo para este parámetro por vía IM (0,17 h) se registró en pollos (El-Gendy *et al*, 2009).

Otra forma de analizar la absorción es a través del tiempo medio de absorción (TMA) que para las cabras de la etapa I es de 1,23 ± 0,08 h. Dicho valor ofrece otra perspectiva de la absorción, dejando en evidencia la magnitud de este proceso para la CFQ por vía IM en cabras. No está disponible este parámetro en las publicaciones con CFQ en distintas especies animales, puesto a que en las mismas se ha trabajado con modelos compartimentales, y por lo general no suelen tener en cuenta este parámetro.

Luego de haberse absorbido la CFQ tras la administración IM, la distribución y la eliminación son similares a la ruta IV. El TMR de la vía IM en las cabras de la etapa I es de 2,74 h, superior al de la vía IV (1,51 h) por el proceso de absorción que se incluye. Justamente de la diferencia de estos dos valores (1,23 h) corresponde al TMA.

La T½$\lambda_e$ de CFQ tras la administración IM (1,76 h) resultó ser la misma que la del estudio de Errecalde *et al* (2001) también realizado en cabras y similar a la resultante de los trabajos realizados en terneros (Errecalde *et al*, 2002) y cerdas en lactación (Block *et al*, 2005) con T½$\lambda_e$ de 1,56 y 1,50 h, respectivamente. Valores diferentes de dicho parámetro están informados por Tohamy (2011) en ovejas de un año edad (3,91 h), Li *et al* (2008) en cerdos jóvenes (4,36 h), El-Gendy *et al* (2009) en pollos (3,50 h) y por Al-Taher (2010) en camellos (10,24 h). Las diferencias, se deberían, no sólo a la especie animal, edades, preñez y lactancia, sino como se explicó anteriormente, por la naturaleza híbrida de dicho parámetro que depende del Vd y el Cl y estos a su vez, de la unión a proteínas del plasma, flujo renal (Q) y coeficiente de extracción renal (E). Así, es probable que la T½$\lambda_e$ de 10,24 h informada en camellos por Al-Taher (2010), se deba a la baja capacidad de extracción de los camellos como consecuencia de su capacidad de privación de agua.

Otras consideraciones que se deben tener en cuenta en las diferencias encontradas en los parámetros de distribución y eliminación, entre los distintos trabajos, son debidas a los modelos elegidos para describir el perfil farmacocinético, a los límites de cuantificación de las técnicas analíticas y a los valores que toman las pendientes de cada fase. Estos valores dependen del criterio de selección de los puntos que intervienen en el cálculo de las mismas. Con el objeto de lograr el mejor ajuste ($r^2$) en dichas rectas, se pueden seleccionar tres o más puntos, que variará según criterio de la persona que realice el análisis farmacocinético. De esta forma se obtiene un valor para las pendientes, que afectará al valor de la constante de eliminación ($\lambda_e$) y que a su vez es utilizada para el cálculo de los diferentes parámetros (ver materiales y métodos).

### V.3.3.- Etapa II: cefquinoma en cabras gestantes

#### V.3.3.1.- Etapa IIa: Farmacocinética por vía IV e IM

Dado que la mayor parte del tiempo de vida de una cabra se encuentra gestante y/o en lactación, y por lo tanto la administración de fármacos a la madre va a coincidir muy posiblemente con uno de los dos estadios, es por lo que se fundamenta la realización de esta fase experimental para poder aportar datos de las modificaciones farmacocinéticas que inciden en la posología de la CFQ durante la gestación.

Administración intravenosa

Al comparar los valores del Vd de la CFQ administrada por vía IV en las cabras vacías de la etapa I ($Vd_{ss}$: 377,35 ± 37,75 ml/kg y $Vd_{área}$: 578,38 ± 141,22 ml/kg) con las preñadas de la etapa IIa ($Vd_{ss}$: 340,77 ± 80,62 ml/kg y $Vd_{área}$: 503,77 ± 161,71 ml/kg), se evidencia que no existen diferencias significativas entre estas dos etapas ($p > 0,05$), lo cual indica que la gestación avanzada no afecta la distribución de la CFQ luego de la administración IV en cabras.

A tenor de lo publicado previamente sobre las variaciones farmacocinéticas en individuos gestantes frente a los no gestantes, cabría esperar que se hubieran producido diferentes resultados respecto a la distribución de CFQ en las cabras de la etapa IIa. Durante el último tercio de la gestación ocurren los mayores cambios fisiológicos que pueden afectar a los parámetros farmacocinéticos (Dawes y Chowienczyk, 2001). Dichos cambios, están muy estudiados en mujeres, donde se ha visto que ocurre un incremento del volumen intravascular (plasmático) y el contenido de agua extravascular (más del 60 % en útero, placenta, feto, líquido amniótico, glándula mamaria y en algunos casos edema periférico) (Pavek *et al*, 2009). De esta forma el agua corporal se incrementa notablemente y genera un gran espacio donde lógicamente al incrementarse el Vd disminuye la concentración de fármacos hidrofílicos (Dawes y Chowienczyk, 2001).

Aunque existen trabajos realizados en animales que concuerdan con este razonamiento (Oukessou *et al*, 1990; Oukessou y Toutain, 1992), los nuestros no demuestran que se siga con la evolución del mismo, puesto a que el $Vd_{ss}$ de las cabras vacías es superior (aunque no significativamente) al de las preñadas. La ausencia en la diferencia de dicho parámetro también fue registrado en el estudio realizado por Block *et al* (2005) con CFQ en cerdas vacías (en lactación) y con gestaciones tempranas y tardías. Igualmente se evidenciaron $Vd_{ss}$ mayores en grupos de individuos no gestantes respecto a los gestantes, sin ser significativamente diferentes, en los trabajos de Santschi y Papich (2000) con gentamicina en yeguas, Ambros *et al* (2011) con cefalexina en cabras, e incluso Popović *et al* (2007) que también señalaron esta característica referida al Vd, administrando individualmente ceftriaxona, cefazolina y gentamicina en grupos de mujeres embarazadas y no embarazadas. Quienes registraron el efecto de un $Vd_{ss}$ significativamente mayor en el grupo de hembras vacías respecto a las preñadas (con gestaciones avanzadas dentro del último tercio) fueron Bengtsson *et al* (1997) con penicilina G en grupos de ovejas y vacas.

Al igual que el Vd, en nuestro trabajo tampoco hemos hallado diferencias ($p > 0,05$) entre la etapa I y IIa para la $C_{max}$ (11,27 ± 0,53 µg/ml y 11,06 ± 1,37 µg/ml para I y IIa,

respectivamente) y la T½$\lambda_e$ (1,61 ± 0,41 h y 1,88 ± 0,26 h etapas I y IIa, respectivamente). La ausencia de significación estadística en este último parámetro probablemente se deba al efecto del desvío estándar que ejercen dos animales de la etapa I, con T½$\lambda_e$ mayores al resto, o bien a las propias características híbridas del parámetro (como se mencionó en los animales de la etapa I).

Pese a la ausencia de diferencias en la T½$\lambda_e$, podemos argumentar que la eliminación de la CFQ por vía IV es afectada por la gestación, debido a que existen diferencias significativas en el Cl (250,54 ± 19,31 ml·kg/h y 183,10 ± 35,59 ml·kg/h en las etapas I y IIa, respectivamente) y en el TMR (1,51 ± 0,15 h y 1,85 ± 0,21 h en las etapas I y IIa, respectivamente). Además en la figura 31 se puede observar como “sobresale” la curva de disposición sérica de las cabras gestantes, respecto al de las vacías, evidenciándose este efecto en un ABC mayor (8,02 ± 0,63 µg·h/ml y 11,22 ± 1,84 µg·h/ml etapas I y IIa respectivamente; $p > 0,05$). A su vez el ABCM es significativamente mayor en las gestantes (12,13 ± 1,72 µg·$h^2$/ml y 20,73 ± 3,81 µg·$h^2$/ml etapa I y IIa, respectivamente) lo que se traduce, conjuntamente con el mayor valor de ABC, en un TMR superior en las cabras de la etapa IIa.

Nuevamente existen discrepancias en los parámetros farmacocinéticos durante la gestación, en este caso referidos a la eliminación, resultantes de nuestra experiencia y a comparación con los de otros trabajos. De acuerdo a los fundamentos de Dawes y Chowienczyk (2001) sobre estudios en mujeres, la eliminación de fármacos hidrofílicos es más rápida, ya que como consecuencia del aumento en la volemia se incrementa el gasto cardíaco y la tasa de filtrado glomerular, sumado a que la unión a proteínas plasmáticas tiende a disminuir y por ende se incrementa la fracción libre de fármacos, favoreciendo dicha eliminación (aunque en el caso de los fármacos con baja unión a proteínas plasmáticas este efecto apenas influiría). Este fundamento es consistente con los resultados de Oukessou y Toutain (1992) quienes trabajaron con gentamicina IV en ovinos, donde los resultados del Cl muestran ser mayores en las hembras hacia el final de la preñez, respecto a las que estaban en la mitad de la misma.

Evidentemente, la influencia de la gestación en la cinética de los fármacos no está aún claramente definida, pues así como existen resultados contradictorios en el Vd, también los hay en el Cl, TMR y T½$\lambda_e$. Nuestros resultados son concordantes con una serie de trabajos publicados en la literatura científica. Por ejemplo, Bengtsson *et al* (1997) administraron penicilina G vía IV en ovejas obteniendo un Cl promedio de 695 y 1160 ml·kg/h en preñadas y vacías ($p < 0,05$), respectivamente; estos autores también administraron pencilina G en vacas y los valores medios de Cl fueron de 471 y 590 ml·kg/h

en preñadas y vacías ($p < 0,05$), respectivamente (el TMR fue mayor en las gestantes en ambas especies, $p < 0,05$). Oukessou *et al* (1990), trabajando con bencilpenicilina IV en ovejas, no encontraron diferencias significativas en TMR que fue superior en las preñadas respecto a las vacías. Lo mismo para la experiencia informada por Santschi y Papich (2000) quienes tampoco encontraron diferencias significativas en el Cl de la gentamicina vía IV en yeguas preñadas (63,6 ml·kg/h) *versus* vacías (66,6 ml·kg/h), ni el caso de Ambros *et al* (2011) trabajando con cefalexina IV en cabras, (con valores Cl de 250 y 350 ml·kg/h en gestantes y vacías respectivamente). Tampoco se registraron diferencias en el Cl de la cefazolina ni en el de la gentamicina en el trabajo realizado en mujeres embarazadas (Popović *et al*, 2007), aunque sí fue significativamente menor el Cl con ceftriaxona en las embarazadas respecto a las no embarazadas; a su vez estos autores informan valores superiores (aunque sin diferencias significativas) de $T½\lambda_e$ para la ceftriaxona y cefazolina en embarazadas respecto a las no embarazadas.

Tanto la ausencia de diferencias significativas en el Vd de la CFQ tras la vía IV, como la disminución en el Cl ($p < 0,05$) en las cabras de la etapa IIa respecto a las de la etapa I, podrían tener como denominador común, el aspecto referido a la dosis administrada en ambos grupos. Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de la CFQ, es decir una molécula hidrofílica que se ioniza en elevada proporción en plasma, se puede decir que la misma tiende a distribuirse predominantemente en forma intravascular, tal como se aprecia en las cabras de la etapa I. Relacionado a ello, muy difícilmente se pueda distribuir hacia el feto, evidenciándose este hecho con que no hayamos encontrado concentraciones de CFQ en sangre fetal (ver resultados en la etapa IIb). Por otro lado, en una hembra preñada, fundamentalmente en el último tercio, el útero junto al feto, la placenta y los líquidos fetales, constituyen entre un 8 al 18 % del peso corporal total materno (Smith y Sherman, 2009), y que en el caso de nuestro trabajo este incremento del peso corresponde al 8 al 10 % (pues las medias de peso de las cabras de la etapa I y IIa son de 47,6 kg y 52,5 kg, respectivamente). Como las dosis totales administradas en las cabras de la etapa IIa, tanto para la vía IV como para la IM, se calcularon según el peso corporal del animal y teniendo en cuenta que la CFQ no difunde hacia el feto, la dosis administrada estaría sobredimensionada en las hembras preñadas en la misma proporción (8 a 10 %) que el incremento del peso por la propia gestación. Por lo tanto es probable que si se hubiese corregido la dosis en las cabras de la etapa IIa teniendo en cuenta estas características, el comportamiento farmacocinético de la CFQ hubiese sido muy parecido al de las cabras de la etapa I, tal como lo informado por Block *et al* (2005) con CFQ en cerdas. Claro está que, en forma práctica, lo recomendable es administrar la misma dosis que en una cabra vacía (como lo hemos hecho en nuestro estudio), más aún

considerando que la CFQ es un ATM con elevado índice terapéutico y que no habrá problemas de sobredosificación; en todo caso se debe considerar que se eliminará más lentamente en una cabra preñada, por lo que se podría incrementar el intervalo de administración (ver más adelante, en el análisis farmacocinético / farmacodinámico).

Cabe agregar que ni el efecto del enlentecimiento de algunas reacciones metabólicas ni la disminución de la proporción de proteínas plasmáticas en individuos gestantes, como contribución al probable efecto de la disminución del Cl e incremento del Vd, respectivamente (Pavek *et al*, 2009), tendrían influencia en el caso de la CFQ en las cabras de la etapa IIa, pues como se comentó previamente es despreciable el metabolismo de la CFQ y la unión a α-1 glucoproteína ácida plasmática es escasa (< 15 %).

Administración intramuscular

Si bien muchos fármacos muestran variaciones en la absorción oral durante la preñez por estar disminuida la velocidad del vaciado gástrico (Martinez y Modric, 2010), existe poca información acerca de la absorción para fármacos administrados por vía IM; en estos casos habría que considerar que las variaciones en el flujo sanguíneo en el sitio de administración también podrían causar modificaciones en esta fase. Durante la gestación existe una mayor perfusión sanguínea secundaria a la vasodilatación (Dawes y Chowienczyk, 2001), que también existe en las masas musculares, lo cual podría estar explicando la diferencia entre las $C_{max}$ (2,56 ± 0,17 y 3,04 ± 0,41 µg/ml, etapas I y IIa, respectivamente; $p < 0,05$), luego de la exposición IM de CFQ en las cabras gestantes en comparación con vacías.

Aunque existen diferencias en la $C_{max}$ no las hay a nivel de $T_{max}$ (1,17 ± 0,26 h y 1,00 ± 0,27 h, etapas I y IIa respectivamente; $p > 0,05$), traduciéndose esto en una mayor cantidad de fármaco en sangre al mismo tiempo en que ocurre el pico de concentración sérica, en las cabras preñadas respecto a las vacías. Este sería uno de los efectos que repercute en las diferencias observadas sobre el ABC (7,54 ± 0,58 µg·h/ml y 10,39 ± 1,54 µg·h/ml, etapas I y IIa respectivamente; $p < 0,05$) y sobre el ABMC (20,65 µg·$h^2$/ml y 31,04 µg·$h^2$/ml, etapas I y IIa respectivamente; $p < 0,05$). Sin embargo, y como se explicó para la vía IV, la variación en estos parámetros, también podría ser debida a la falta de corrección de la dosis IM en las cabras preñadas.

Por otra parte, pese a que hay un mayor ingreso de fármaco hacia la circulación sanguínea (descriptos por los parámetros ABC y $C_{max}$), la velocidad de entrada de la CFQ

se mantiene sin modificaciones entre gestantes y vacías, como se puede apreciar en la ausencia de diferencias ($p > 0,05$) entre los parámetros de TMA (1,23 ± 0,08 y 1,15 ± 0,26 h para vacías y gestantes, respectivamente) y $T½\lambda_a$ (0,35 ± 0,10 y 0,35 ± 0,04 h para vacías y gestantes, respectivamente).

Además, como existe una mayor ABC en las vías IV e IM de las cabras gestantes respecto a las correspondientes de las cabras vacías, el valor de F de la etapa IIa (92,89 ± 4,35 %) se encuentra casi sin modificaciones ($p > 0,05$) respecto al de la etapa I (94,02 ± 1,37 %). Por lo que se deduce que la proporción que se absorbe en vacías y gestantes es la misma.

Los resultados de los parámetros referidos a la distribución y eliminación de la CFQ tras la administración IM están relacionados a los de la administración IV. Sin embargo no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en los valores de TMR y $T½\lambda_e$ entre las cabras de las etapas I (TMR: 2,73 ± 0,20 h y $T½\lambda_e$: 1,76 ± 0,26 h) y IIa (TMR: 3,00 ± 0,25 h y $T½\lambda_e$: 2,10 ± 0,37 h). Como el TMR es consecuencia de la relación ABMC / ABC, el incremento proporcional de estos dos parámetros en gestantes (un 50 % para el ABMC y un 40 % para el ABC) genera que el TMR en las gestantes sea prácticamente el mismo que en las vacías.

No se disponen de datos bibliográficos para el TMR de CFQ por vía IM en otras especies animales en gestación, pero sí de la $T½\lambda_e$, como por ejemplo la informada por Block *et al* (2005) en cerdas gestantes con un valor de 2,33 h, siendo similar a la $T½\lambda_e$ de nuestro trabajo (2,10 ± 0,37 h).

#### V.3.3.2.- Etapa IIb: Paso a través de la placenta

Como se ha visto en la etapa anterior, la gestación es un estado fisiológico que afecta la farmacocinética. Como el feto junto a los líquidos y membranas que lo rodean, conforman un espacio donde pueden llegar los fármacos, es posible entonces que sea un motivo por el cual se afecta la distribución y eliminación en la madre. Por lo tanto, a modo de fundamentar con mayor precisión la modificación de la cinética de la CFQ en hembras gestantes se optó por realizar esta fase experimental.

Por otra parte, en determinadas ocasiones, y para fármacos que puedan tener un cierto carácter fetotóxico, mutagénico o teratógeno, es necesario determinar el porcentaje de fármaco que llega al embrión/feto para poder establecer, por parte del clínico, un balance de riesgo beneficio entre su uso en la madre y la toxicidad en el hijo. De todas formas, según lo informado por el Comité para los Productos Médicos Veterinarios de la Agencia

Europea del Medicamento (EMEA/MRL/005/95), la CFQ, en estudios llevados a cabo en ratas, no afecta la fertilidad, tampoco es teratógena en estos animales ni en conejos y, en estudios *in vitro,* se comprobó que no es mutagénica ni genotóxica.

Se realizó un ensayo administrando la CFQ en sangre materna al inicio de una cesárea programada, y se buscaron las concentraciones tanto en sangre fetal como materna, para establecer el posible pasaje, a través del cociente Concentración fetal / Concentración materna. Utilizando la sangre venosa, se puede calcular la cantidad de fármaco que le llega al feto ya que, de haber elegido sangre arterial, se habría subestimado el valor real porque se estaría determinando la cantidad de droga que sale del mismo, ignorando de esta manera toda aquella que pudo haber quedado retenida o ser eliminada de estos. Inclusive se extrajo líquido amniótico para evaluar la posible eliminación de la CFQ desde el feto, en caso de que pasara hacia éste, y cotiledón placentario para evaluar la posible cantidad de CFQ existente en esta interfase. Se utilizó un estudio *in vivo* similar al empleado por Heikkilä *et al* (1992), Ramsey *et al* (2003) y Papini *et al* (2006), conociendo de la alta seguridad de la CFQ en cuanto a su falta de teratogenicidad como se mencionó anteriormente y, debido a que se puede llegar a las mismas conclusiones, es de menor complejidad y posee mayor grado de fiabilidad (por no requerir extrapolar datos o situaciones) que los estudios *ex vivo* o *in vitro* utilizados también para este tipo de investigaciones.

Como se puede ver en la tabla 28, luego de la administración de CFQ se extrajeron las muestras de sangre materna entre los 15 y 45 minutos, dependiendo del animal. Estas variaciones fueron debidas al período de tiempo en que surgía el efecto la xilacina, como agente preanestésico, la inducción del animal para que alcance el decúbito lateral y esté en plano anestésico para comenzar con la incisión quirúrgica, pues inmediatamente a ésta se decidía sacarle la muestra de sangre a la cabra desde la vena mamaria. Una vez extraída esa muestra en general los tiempos para los subsiguientes tipos de muestras no superaron en general los 10 minutos. Concordantemente a estos tiempos variaron las concentraciones de CFQ en sangre materna (tabla 29), como se puede ver en los animales a los que se le extrajo sangre entre los 15 y 30 minutos (O, I y X) son casi el doble que el resto de las cabras, a las que se muestrearon ente los 40 y 45 minutos. Todas estas concentraciones concuerdan con los respectivos tiempos de muestreo para las farmacocinéticas IV, realizadas en las cabras de la etapa IIa.

Teniendo en cuenta la circulación materno fetal, la presencia de un xenobiótico en la sangre fetal estaría indicando el paso del mismo a través de la placenta desde la madre hacia el feto, y la presencia en el liquido amniótico la eliminación del agente desde el feto

(Popović *et al*, 2007). En nuestro caso no se han detectado concentraciones de CFQ ni en la sangre venosa fetal ni en líquido amniótico en ninguno de los animales. En las fuentes bibliográficas, no se hallan trabajos similares con betalactámicos en animales; aunque si son abundantes los trabajos realizados en seres humanos (ej: Bergogne-Bérézin *et al*, 1985; Berthelot *et al*, 1988; Fortunato *et al*, 1988; Holt *et al*, 1994; Jørgensen *et al*, 1987). En la gran mayoría de ellos, se encuentran concentraciones fetales de los ATMs estudiados, como en el trabajo de Popović *et al* (2007) realizado en mujeres al momento del parto con ceftriaxona, cefazolina y gentamicina, que evidenciaron su presencia en sangre umbilical y líquido amniótico, siendo las relaciones Concentración fetal / Concentración materna de 1:1 para las dos cefalosporinas y 1:4 para la gentamicina.

Si bien es cierto que la difusión, a través de una membrana, de un fármaco hidrofílico y polar (como los betalactámicos en general y los aminoglucósidos) está más restringido que uno lipofílico y no polar (macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol), la diferencia en la ausencia de paso de CFQ a través de la placenta caprina y la difusión de los betalactámicos (o aminoglucósido) hacia el feto humano, se debería en principio a las diferentes arquitecturas histológicas de las placentas (figura 4). En el caprino, cuya placenta es sinepiteiliocorial (Hafez *et al*, 2010), el fármaco debe atravesar un total de siete membranas (endotelio capilar materno, membrana basal materna, tejido conjuntivo endometrial, epitelio coriónico, tejido conjuntivo fetal, membrana basal fetal, endotelio capilar fetal), mientras que en la mujer, al tomar contacto la sangre materna directamente con el epitelio coriónico el paso del fármaco a través de la placenta es menos dificultoso (Marin *et al*, 2004).

Por otra parte, el tamaño molecular también influye en la difusión de un xenobióitco por la placenta. La comparación de flujos feto-maternos de diferentes moléculas insolubles en lípidos (urea, eritritol, manitol, y EDTA-Cr) revelaron una disminución abrupta en la permeabilidad de la placenta de la oveja en la medida que aumentó el tamaño molecular (Stacey *et al*, 1977); en este trabajo la placenta de la oveja exhibió una selectividad de tamaño que excluyó las moléculas mayores a 0,45 nm de radio. Considerando estos datos la CFQ, con un tamaño mayor, estaría imposibilitada de pasar por dicha placenta.

Además, la placenta en su rol de protector fetal posee distintos sistemas encargados de limitar el pasaje de sustancias para disminuir su presencia en el feto, que no se limitan solamente a la estructura morfológica. En los años recientes se han profundizado los estudios en farmacología molecular y farmacogenética fundamentalmente sobre las placentas de roedores y mujeres, debido a la presencia de estructuras proteicas que actúan como bombas de expulsión de aquellos xenobióticos que pudieran pasar hacia el

feto (Marin *et al*, 2004). Estas proteínas (glucoproteínas P o P-gp, proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas MDRP y proteínas de resistencia al cáncer de mama BCRP; Pavek *et al*, 2009) son capaces de bombear una variedad extremadamente amplia de compuestos químicos estructuralmente diferentes, incluyendo fármacos citotóxicos, ATMs, opiáceos, antieméticos y muchos otros xenobióticos (Schinkel y Jonker, 2003; Fromm, 2004) a través de la placenta, en dirección feto-madre, ofreciendo con ello la protección al feto en desarrollo.

Como se mencionó antes, si bien estas bombas han sido identificadas en la placenta de roedores y de seres humanos, es posible que estén también presentes en la placenta de la mayoría de los animales. Estudios realizados en ovejas tras la administración de ivermectina, un endectocida que es sustrato de las P-gp, demostraron que el pasaje desde la madre al feto fue escaso, mientras que cuando la droga fue administrada a los fetos, el pasaje hacia la madre fue mucho mayor (Pérez *et al*, 2008a y 2009); esto pone en evidencia la presencia de estos transportadores y su función en el pasaje de xenobióticos desde ambos lados de las membranas placentarias. A su vez, cuando la droga fue administrada junto con un inhibidor de estas bombas (verapamilo), el pasaje hacia el feto se incrementó notablemente (Pérez *et al*, 2010).

Otro mecanismo enunciado que limita el paso de xenobióticos al feto, es la actividad metabólica de la placenta, pues en ella se encuentran las enzimas implicadas en las reacciones de fase I y II hepáticas (Ceckova-Novotna *et al*, 2006; Mao, 2008), aunque pensamos que este mecanismo no se emplearía en el caso de la CFQ, debido a que básicamente no sufre metabolización.

En la interfase madre-feto, en el cotiledón placentario, se detectaron diferentes concentraciones de CFQ, que corresponderían, según lo dicho anteriormente, a la sangre materna. Sin embargo estas concentraciones son bajas, y en un animal no se detectó CFQ probablemente por cuestiones metodológicas.

### V.3.4.- Etapa III: cefquinoma en cabras lactantes

#### V.3.4.1.- Etapa IIIa: Farmacocinética por vía IV e IM

<u>Administración intravenosa</u>

El perfil de disposición sérica de la CFQ administrada por la vía IV en cabras en lactación (etapa IIIa), es muy parecido al de las cabras adultas no gestantes ni lactantes (etapa I) (figura 31). De hecho, y como se puede ver en el apartado IV.4.3., sólo se observan

diferencias ($p < 0,05$) en la $C_{max}$ (11,27 ± 0,53 y 9,28 ± 0,66 µg/ml, etapas I y IIIa respectivamente).

Los valores del ABC son muy similares entre los animales de la etapa I (8,02 ± 0,63 µg·h/ml) y los de la etapa IIIa (8,14 ± 0,52 µg·h/ml) al igual que en los valores respectivos del Cl (250,54 ± 19,31 y 246,53 ± 15,24 ml·kg/h), $Vd_{ss}$ (377,35 ± 37,75 y 422,41 ± 54,35 ml/kg), $T½\lambda_e$ (1,61 ± 0,41 y 1,50 ± 0,23 h) y TMR (1,51 ± 0,15 y 1,71 ± 0,14 h). En este sentido, Block *et al* (2005) tampoco encontraron diferencias entre las ABC de la CFQ vía IV administrada en cerdas en lactación y en cerdas con gestaciones tempranas (de 45 días donde el comportamiento farmacocinético en esta etapa de gestación no presenta diferencias con hembras no preñadas; Dawes y Chowienczyk, 2001). Igualmente no se encontraron diferencias significativas en los parámetros $T½\lambda_e$, $Vd_{ss}$, Cl y ABC, al comparar al perfil farmacocinético de la cefalexina IV entre grupos de cabras lactantes y no lactantes ni gestantes (Ambros *et al*, 2011).

Respecto a la comparación entre los parámetros de las cabras lactantes (IIIa) con gestantes (IIa) se evidencian diferencias ($p < 0,05$) en forma respectiva en la $C_{max}$ (9,28 ± 0,66 y 11,06 ± 1,37 µg/ml), ABC (8,14 ± 0,52 y 11,22 ± 1,84 µg·h/ml), ABCM (13,86 ± 0,85 y 20,73 ± 3,81 $\mu g \cdot h^2/ml$) y Cl (246,53 ± 15,24 y 183,10 ± 35,59 ml·kg/h). El $Vd_{ss}$ fue superior en cabras de la etapa IIIa (422,41 ± 54,35 ml/kg) respecto a las de la IIa (340,77 ± 80,62 ml/kg) pero sin ser significativa, hecho que puede ser debido a la elevada desviación estándar que presentan estos valores. Datos de Vd y Cl significativamente superiores en animales lactantes respecto a gestantes, fueron observados por Bengtsson *et al* (1997) administrando penicilina G en grupos de vacas y en ovejas, y por Ambros *et al* (2011) con cefalexina en cabras. Estos autores atribuyen estas diferencias al hecho de que los animales en lactancia distribuyen y eliminan los ATMs estudiados hacia la glándula mamaria. Por su parte Santschi y Papich (2000) también informan estas diferencias, aunque no significativas, en yeguas lactantes y preñadas, administrándoles gentamicina. En este caso la ausencia de eliminación de gentamicina en leche podría ser la causa de esta ausencia de diferencia. Sin embargo, es de destacar que en ninguno de estos trabajos que se mencionan, se determinaron las concentraciones de los respectivos ATMs en leche.

Como acabamos de mencionar el Cl es significativamente diferente entre animales lactantes y gestantes al igual que ocurre entre las cabras vacías y las gestantes, pero no existen diferencias significativas entre vacías y lactantes. Por tanto, el motivo de la diferencia en el Cl en estas etapas sería prácticamente el mismo que el explicado

previamente en las cabras de la etapa IIa (gestantes), siendo atribuible básicamente al cálculo de la dosis por la diferencia de peso (preñadas frente al resto).

Por otra parte, la falta de diferencias en el Vd en las tres etapas indica que la CFQ se distribuye de la misma forma en cualquier estado fisiológico, no pasando el ATM desde la sangre a la leche (ni al feto). De la misma forma que este hecho fue constatado por la carencia de concentraciones de CFQ en el feto, esto se evidencia por la ausencia de concentraciones de CFQ en la leche de las cabras de la etapa IIIa.

Administración intramuscular

También son similares las curvas de concentración sérica de CFQ *vs* tiempo de las cabras lactantes y la de las no lactantes ni gestantes tras de la administración IM, tal como se puede apreciar en la figura 37. Nuevamente y en forma similar a lo acontecido en la vía IV, los parámetros farmacocinéticos entre estas dos etapas son muy similares ($p > 0,05$ en $T½\lambda_a$, $C_{max}$, $T_{max}$, $T½\lambda_e$, TMR, ABC, ABMC y F), existiendo sólo diferencias ($p < 0,05$) en el TMA con valores de 1,23 ± 0,08 h para las cabras de la etapa I y 0,88 ± 0,12 h para las de la etapa IIIa.

Cuando se comparan los parámetros cinéticos de la CFQ tras la vía IM de las cabras gestantes con las lactantes, se aprecian diferencias significativas respectivamente para el ABC (10,39 ± 1,54 y 7,50 ± 0,50 µg·h/ml), ABMC (31,04 ± 4,44 y 19,39 ± 1,68 µg·$h^2$/ml) y $C_{max}$ (3,04 ± 0,41 µg/ml y 2,48 ± 0,15 µg/ml) del mismo modo que lo ocurrido para la vía IV; en forma adicional se observan diferencias ($p < 0,05$) en la $T½\lambda_e$ (2,10 ± 0,37 y 1,57 ± 0,26 h) y TMR (3,00 ± 0,25 y 2,59 ± 0,17 h) para las gestantes y lactantes, respectivamente. La diferencia en el TMR se debe básicamente al mayor incremento en el ABMC de las gestantes respecto a las lactantes (un 60%) en relación al incremento que sufre el ABC (un 40 %), hecho que incide directamente en el las diferencias observadas en el TMR entre ambos grupos, dado a que proviene de la relación ABMC / ABC.

La menor $T½\lambda_e$ en las cabras de la etapa IIIa haría pensar que la lactancia influye de algún modo en la menor permanencia de la CFQ en el organismo, tal como lo describen Block *et al* (2005) con CFQ en cerdas gestantes y lactantes. Sin embargo, en nuestro caso, no se observan diferencias en este parámetro entre las lactantes con las de la etapa I de referencia (no lactantes ni gestantes), tanto para la vía IM como para la IV, y tampoco se aprecian concentraciones en leche de este ATM en la mayoría de las cabras, por lo que no podemos argumentar que la lactancia afecte la semivida de eliminación de la CFQ.

Pocos trabajos evalúan las concentraciones de CFQ en leche luego de una administración extramamaria. Se han encontrado bajas concentraciones de CFQ en leche de cerdas hasta las 24 h postadministración, tanto para la vía IV como IM (Block *et al*, 2005). Los autores atribuyen parte de este efecto a que los ensayos fueron realizados en cerdas que acababan de parir; de tal manera que, la extracción de leche tuvo que ser forzada mediante la aplicación de 5 UI/animal de oxitocina IV, lo que pudo contribuir a la aparición de la CFQ en la leche.

A su vez Ehinger *et al* (2006) hallaron entre 0,2 a 0,5 µg/g de CFQ en tejido mamario vacuno, entre las 2 y 6 h postadministración. A diferencia de otros trabajos, este estudio fue realizado *ex vivo* en glándulas mamarias extraídas post-mortem de vacas lactantes, y la CFQ fue adicionada al fluido de perfusión simulando un tratamiento sistémico. Es de destacar que no se analizaron muestras de leche, sino de tejido mamario que incluye los capilares por donde circula la CFQ, y por lo tanto esto estaría contribuyendo a la detección de concentraciones de este ATM, es decir que no implica que se haya producido paso a través del epitelio capilar. Esto sería similar a la situación de nuestro estudio en etapa IIb, donde se analizaron las muestras de cotiledón placentario.

Se han realizado estudios con CFQ vía IM (1 mg/kg / 24h; dos administraciones) en vacas lactantes con mastitis clínica producida por *E. coli* (Shpigel *et al*, 1997) y en vacas secas con mastitis subclínica a *S. aureus* (Shpigel *et al*, 2006). Si bien en ambos casos se estudió la eficacia y no se realizaron las determinaciones de concentraciones de CFQ en leche, se podría inferir que parte del ATM debió llegar a la leche pues resultó eficaz en el tratamiento frente a *E. coli* e inhibió un bajo porcentaje de *S. aureus* (al tratarse de vacas secas la formación de leche es mínima o nula y dificulta el paso de sangre a leche). En estos casos se debería tener en cuenta la falta de integridad de la barrera alveolar mamaria que separa la sangre de la leche, debido a que en los casos de mastitis se afecta dicha barrera y se altera el flujo bidireccional de fármacos, tal como lo demuestran los trabajos de Erskine *et al* (1995) con ceftiofur IV, Ziv *et al* (1995) con el aminoglucósido apramicina administrado por las vías IV e IM, Gips y Soback (1999) con norfloxacina administrada por vía IV y Lucas *et al* (2010) con azitromicina IM en vacas con y sin mastitis.

Por lo tanto, es discutible la cuantía de CFQ que pasa hacia la leche, teniendo en cuenta las diferencias entre especies animales y el estado de salud de la ubre. En nuestro caso, en animales cínicamente sanos de la etapa IIIa, sólo se detectaron en dos muestras, concentraciones de CFQ por encima del límite de cuantificación luego de la administración IV y que corresponden a un animal, y en el resto de los individuos no hubo registros

cromatográficos compatibles con la presencia de CFQ en la leche por encima del nivel de cuantificación. Este comportamiento sería similar al del ceftiofur, con poco o ningún paso hacia la leche, inclusive de origen caprino (Doré *et al*, 2011). Sin embargo, la ausencia del paso a leche del ceftiofur como su metabolito (desfuroil-ceftiofur) están influenciados por la elevada unión a proteínas del plasma que presentan (Erskine *et al*, 1995 y 1996), hecho que no sucede con la CFQ.

También se registraron bajos niveles de CFQ en la leche de dos animales, luego de la administración IM. Uno de ellos sólo hasta las cuatro horas y el otro hasta las ocho horas postadministración (concentraciones ≤ 0,112 µg/ml). Es de destacar que en este último animal (T) fue donde se hallaron las concentraciones de CFQ en leche luego de su administración IV, lo que indica la mayor permeabilidad de la glándula mamaria de este individuo en particular, teniendo en cuenta que no existía una infección subyacente. Tanto la producción de leche como el pH de la misma se tuvieron en cuenta debido a que son dos factores que pueden incidir sobre la farmacocinética en animales lactantes (Baggot, 1977; Litterio *et al*, 2007; Chicoine *et al*, 2009; Lucas *et al*, 2010); pero aparentemente estas dos variables no habrían influido en la despreciable presencia de la CFQ en la leche de estas cabras debido a que en general tanto la producción láctea como el pH son similares en todos los animales (tablas 30, 31, 33 y 34).

Existen trabajos donde se demuestra la presencia de bombas de expulsión (P-gp y otras) en las membranas que conforman la barrera sangre / leche (Edwards *et al*, 2005; Al-Bataineh *et al*, 2010; Antonić *et al*, 2011; Mealey, 2012). También se ha visto que la localización específica de las mismas sería en el epitelio alveolar mamario (es decir en contacto con la leche) y que funcionan moviendo iones orgánicos, en sentido predominantemente basolateral – apical en dicho epitelio (Al-Bataineh *et al*, 2009), es decir que la resultante del flujo de iones es desde la sangre hacia la leche. Por lo tanto, y teniendo en cuenta sólo la presencia de estas bombas y la dirección de flujo en la que funcionan, sería probable que la CFQ pase desde la sangre hacia la leche.

Sin embargo, fue comentado con anterioridad que el carácter hidrofílico y predominio polar de la CFQ impide o dificulta el paso por una membrana biológica, más aún si se tiene en cuenta que para acceder a dichos transportadores desde la sangre, la CFQ debe atravesar varias membranas, que corresponden al endotelio capilar con su membrana basal, las células mioepiteliales que recubren al alvéolo mamario, la membrana basal de dicho alvéolo y finalmente el epitelio alveolar (Gehring y Smith, 2006) donde estarían las P-gp.

Finalmente, el hecho de que la CFQ pase muy limitadamente a la leche de las cabras, puede tener un punto de vista negativo para el tratamiento de las mastitis caprinas por vías sistémicas, pero positivo para otras patologías infecciosas que cursan durante el período de lactancia de una cabra, ya que la probabilidad de que deje residuos en la leche es baja y por otro lado no lo ingerirían cabritos que consumieran esa leche y consecuentemente no afectaría a la flora de su tracto digestivo.

#### V.3.4.2.- Etapa IIIb: Farmacocinética por vía IMM

La dosis IMM (10 mg / medio mamario) que se les administró a las cabras de la etapa IIIb, como se comentó en un principio, se tuvo en cuenta por extrapolación desde la especie bovina ya que el preparado comercial está formulado para vacunos. Dicha dosis se calculó considerando un volumen teórico de producción diario total de uno a dos litros de leche. Además se colocaron tres dosis cada doce horas, según las recomendaciones del laboratorio elaborador del medicamento, con el objeto de simular un esquema terapéutico.

No se han encontrado diferencias ($p < 0,05$) entre los parámetros farmacocinéticos determinados a partir de las concentraciones de CFQ en leche entre las 0 y 12 h luego de la primera y la última administración (tablas 41 y 42). Hay que considerar que la ausencia en estas diferencias, entre las dos administraciones, pueden ser debidas a la variabilidad de los parámetros individuales los que a su vez están influenciados por la dispersión de los valores de concentraciones de CFQ en leche, reflejados en la figura 20 y tabla 40.

Nuestro valor de $T½\lambda_e$ luego de la última administración de CFQ en el intervalo registrado como “0 – final” en la tabla 42, (5,94 ± 0,66 h), es similar al del trabajo publicado por Zonca *et al* (2011) con un valor de 6,21 ± 3,95 h, quienes también trabajaron con CFQ IMM, pero en vacunos, a la dosis de 75 mg por cuarto mamario en un esquema de administración similar al descripto en esta tesis (tres dosis totales con un intervalo de 12 h). Además nuestra $T½\lambda_e$ resultó parecida a la de otros betalactámicos IMM administrados en vacas lactantes, siendo sus valores de 6,7 ± 2,07 h para ceftiofur (Smith *et al*, 2004), 3,99 ± 1,48 h para cefapirina (Stockler *et al*, 2009) y 6,73 ± 2,91 h para cefoperazona (Cagnardi *et al*, 2010).

Por otra parte, y considerando las desviaciones estándares, el TMR de las cabras de la etapa IIIb (4,35 ± 1,77 h, valor luego de la última administración hasta el final de las concentraciones cuantificadas; en general hasta las 48 a 60 h) también fue parecido a los de los vacunos para CFQ (6,58 ± 2,05 h; Zonca el al, 2011), cefapirina (3,34 ± 2,04; Stockler *et al*, 2009), y cefoperazona (8,37 ± 1,51 h; Cagnardi *et al*, 2010).

Gehring y Smith (2006), describen los distintos factores que influyen en el tiempo de permanencia y en las concentraciones en leche de los fármacos que se dan en forma IMM; el estado sanitario de la glándula mamaria, el volumen de producción y el pH de la leche son algunos de los más importantes, motivo por el cual se tuvieron en cuenta en esta tesis.

Existen evidencias que sugieren que los animales que producen un menor volumen de leche tienen una eliminación más lenta de los fármacos IMM, que los animales que producen mayores volúmenes de leche; esta correlación fue demostrada en los trabajos de Whittem (1999) con pirlimicina IMM y de Smith *et al* (2004) con ceftiofur IMM, en vacunos. Resultados similares son informados por Karzis *et al* (2007) determinando los tiempos de espera para ampicilina, cloxacilina, cefalexina y neomicina, en vacas y cabras de alta y baja producción. Esto es debido a que en igualdad de dosis, los animales que producen un mayor volumen de leche, tienen mayor capacidad de vaciar su glándula mamaria, eliminando la leche (junto a la CFQ en este caso) en menor tiempo que los animales de menor producción. En nuestro caso se puede apreciar esta relación en la producción promedio registrada en la tabla 32 y el Cl en leche (tablas 41 y 42), donde los valores producción (de menor a mayor) fueron para las cabras Z, T, E, R, U y Q de 178,46; 198,46; 296,92; 300,77; 353,08 y 536,92 ml, y los de Cl en la tercera administración de 5,50; 6,32; 7,74; 8,13; 20,68 y 13,86 ml·kg/h, respectivamente.

Pese a la baja producción general registrada en estas cabras, el tiempo de permanencia de la CFQ en la glándula mamaria (60 h luego de la última administración, (tabla 40) es similar al de otros trabajos con betalactámicos IMM. Así por ejemplo, Long *et al* (1984) hallaron concentraciones de penicilina hasta las 60 h y de cefapirina hasta las 48 h en cabras; Egan y Meaney (1985) detectaron cloxacilina y penicilina en leche vacuna hasta las 64 y 72 h, respectivamente; Roncada *et al* (2000) encontraron dicloxacilina hasta las 48 h en vacas, y hasta las 84 h en ovejas. Estas investigaciones, si bien no analizan los parámetros farmacocinéticos, hacen hincapié en la duración del ATM en la ubre, teniendo esto suma importancia en el análisis del parámetro FC/FD de eficacia (T > CIM, *vide infra*).

Debido a que la concentración de una sustancia es equivalente a la relación entre la masa de la misma en un determinado volumen, es evidente que si varía dicho volumen (manteniendo constante la masa), también lo hará la concentración en forma inversamente proporcional. En nuestro caso, la cantidad de CFQ administrada (10 mg / medio mamario) fue constante en todas las cabras, sin embargo hubo variación en volumen de leche producido (tabla 32), y esto, en principio, fue lo que hizo que las

concentraciones entre individuos para una misma toma, fueran dispersas (figura 20 y tabla 40). De esta forma la CFQ se concentra más en la leche de las cabras de baja producción que en las de mayor producción, hecho que se puede constatar al correlacionar la producción con el ABC de cada cabra. Si en lugar de considerar al ABC en leche como la cantidad administrada por unidad de volumen (es decir la concentración) en el tiempo, se corrige por la producción media de cada individuo, se podrá observar que las ABC son similares. Por ejemplo el ABC en la leche luego de la tercera administración en el animal "Z" es de 2.597,10 µg·hr/ml, y su producción es 178,46 ml (tabla 32), por lo tanto quedaría un ABC de 463.478 µg·hr, que muy similar al del animal "U" (ABC de 472.463 µg·hr) que produce 353,08 ml y tiene un ABC en la tercera administración de 1.338,12

Independientemente de estas variaciones, el valor medio del ABC en la leche de las cabras de la etapa IIIb (1.804,42 ± 575,23 µg·h/ml en la tercera administración) es muy parecido al registrado por Zonca *et al* (2011) cuyo valor luego de administrar CFQ IMM en la tercera dosis en vacas (75 mg /cuarto), fue de 1.780,74 ± 832,57 µg·h/ml.

Por otra parte al igual que en dicho trabajo, hemos detectado concentraciones de CFQ en el suero de las cabras de la etapa IIIb, siendo las mismas inconstantes e insignificantes. Sólo se pudo determinar el ABC luego de la tercera administración en el suero de cuatro animales, ya que los otros dos (E y Q), poseen insuficientes concentraciones en el tiempo, como para realizar un análisis farmacocinético. De esta forma, los ABC de las cabras R, T, U y Z fueron de 7,38; 8,39; 5,78 y 2,59 µg·h/ml, respectivamente, siendo la relación ABC leche / ABC suero para cada animal de 238,05; 269,11; 231,51, 1.002,74 respectivamente. Se puede ver que en los tres primeros animales la relación es similar, siendo en promedio 246 veces superior la cantidad de CFQ en leche que en suero, y en el animal Z, más de 1000 veces. Como observación particular, el animal T, que es el mismo animal empleado en la etapa IIIa, es uno de los que presenta mayores concentraciones en sangre, reforzando la hipótesis de que este individuo posee una elevada permeabilidad en la barrera sangre / leche.

Es notable que la CFQ pase en mayor magnitud desde leche a sangre y en forma insignificante en el sentido contrario. Un factor que puede contribuir a ello es la diferencia de concentraciones de CFQ registrados a ambos lados de las membranas que separan la sangre de la leche. Esto se podría constatar al observar la $C_{max}$ alcanzada en leche luego de la última administración IMM en las cabras de la etapa IIIb (272,36 ± 112,40 µg/ml), y la correspondiente $C_{max}$ en suero luego de la administración IV en las cabras de la etapa IIIa (9,28 ± 0,66 µg/ml); a su vez el ABC luego de la administración IMM es 225 veces mayor respecto al ABC de la administración IV (o inclusive IM de la misma etapa). Por lo tanto, y

según esto, es probable que por diferencias de concentración pase una mayor proporción de CFQ desde la leche a sangre que lo acontecido en sentido contrario.

Relacionado a ello y tal como se comentó en la etapa IIIa, existen transportadores proteicos (tipo P-gp) en el epitelio de los alvéolos mamarios y que expulsan iones orgánicos fundamentalmente en el sentido basolateral – apical, es decir hacia la leche (Al-Bataineh *et al*, 2009 y 2010). Una posibilidad es que dichos transportadores se hayan saturado por la concentración local de CFQ tras la administración IMM, y el exceso del ATM haya pasado a sangre por difusión pasiva.

Nuevamente es importante mencionar el rol del pH (en este caso el de la leche de las cabras, cuyos valores medios están entre 6,40 y 6,79; tabla 35) en interacción con el pKa de la CFQ (con un valor de 2,71). Aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch se obtiene que entre el 0,008 al 0,020 % de fármaco no ionizado está en condiciones de pasar desde la leche a la sangre. SI bien dicho porcentaje es bajo, es 5 a 10 veces más alto que el correspondiente en sangre (volviendo a aplicar la ecuación en un pH sanguíneo de 7,4), hecho que justifica que el paso de CFQ de la leche a sangre sea más factible que de la sangre a leche.

### V.3.5.- Etapa IV: Farmacocinética de cefquinoma en cabritos a diferentes edades

La CFQ, al igual que otros betalactámicos, es un ATM que suele ser de elección para el tratamiento de determinadas infecciones en animales jóvenes (en etapa de desarrollo) debido a su baja toxicidad, motivo por el cual es recomendada por ejemplo, para neumonías, gastroenteritis, artritis, onfalitis, septicemia aguda en potrillos (Rohdich *et al*, 2009) o en casos de septicemias producidas por *E. coli* en terneros (Thomas *et al*, 2004).

Su cinética en animales jóvenes ha sido estudiada en forma aislada, es decir sin comparar lo que sucede durante el crecimiento del individuo, en bovinos (Errecalde *et al*, 2002) y cerdos (Li *et al*, 2008), y evaluando la evolución de la edad, en ovinos (Tohamy, 2011) y equinos (Smiet *et al*, 2012); no se registran hasta el momento los efectos de la edad sobre la cinética de la CFQ en cabritos recién nacidos y en crecimiento. Es importante evaluar dicho efecto en la disposición sérica de los ATMs, debido a las diferencias que suelen existir entre los neonatos y animales adultos, por la propia evolución del organismo que influyen en la composición corporal y desarrollo de los órganos. Estas diferencias, que repercuten en la farmacocinética, suelen afectar al perfil de concentraciones séricas y aquellas que se alcanzan en el sitio de infección (Baggot, 2001).

En nuestro caso y en líneas generales, se puede observar que tras la administración de CFQ por vía IV las curvas farmacocinéticas de los cabritos de 3 y 10 días son similares, al gual que entre los cabritos de 24, 50 y 80 días (figura 21). Además, en la tabla 44 se registra que en los cabritos de 3 y 10 días existen concentraciones de CFQ hasta las 10 h, y desde los 24 días en adelante se pueden ver que las concentraciones de CFQ en suero permanecen un tiempo menor (6 a 8 h en promedio, dependiendo del grupo etario). Estas diferencias son acordes a lo que se visualiza en los diferentes parámetros farmacocinéticos (tabla 45) y cuyas diferencias estadísticas se muestran entre las figuras 23 a 30.

En casi todos los parámetros se puede evidenciar que los grupos de cabritos de 3 y 10 días son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) a los grupos de 24, 50 y 80 días; aunque esto no es tan claro en la $C_{max}$, el $Vd_{ss}$ y el $Vd_{área}$. Sin embargo, y pese a ello, se puede observar que existe una tendencia en que los valores de ambos volúmenes de distribución vayan disminuyendo conforme los cabritos van creciendo, pudiéndose visualizar este efecto en las figuras 28 y 29 mediante el trazado de la recta de regresión, la cual fue calculada por el método de los mínimos cuadrados. Esta tendencia es similar a la informada por Smiet *et al* (2012) en el $Vd_{ss}$, administrando CFQ vía IV a potrillos de 1 a 3 días (370 ± 70 ml/kg), de 42 días (350 ± 60 ml/kg) y equinos adultos (220 ± 40 ml/kg); además se puede ver que, según la edad, los valores del $Vd_{ss}$ son similares entre el mencionado trabajo con los nuestros ($Vd_{ss}$ 367,29 ± 81,24 y 300,49 ± 19,28 ml/kg para los cabritos de 3 y 50 días, respectivamente).

La disminución del Vd conforme el individuo va madurando, también se registra en otros trabajos con betalactámicos en animales (Tsuji *et al*, 1985; Morita *et al*, 1990; Brown *et al*, 1996; Meyer *et al*, 2009) e incluso en personas (Pacifici, 2011). Esto ocurre debido al mayor porcentaje de agua corporal (70 - 75 %), fundamentalmente extracelular, que posee un animal en su edad más temprana respecto a un animal adulto (60 %), líquido que otorga un mayor volumen donde un fármaco puede distribuirse (Baggot, 2001; Pacifici, 2011). Esta explicación es consistente para fármacos hidrofílicos, como la CFQ, o con predominio polar en plasma, ya que se ha observado en moléculas no polares y lipofílicas como la marbofloxacina (administrada vía IV en cabritos de 1, 3, 6 semanas de edad y cabras adultas) que el $Vd_{ss}$ va aumentando con la edad de los animales, debido al desarrollo de espacios extravasculares, tales como los preestómagos, donde ésta molécula puede difundir con mayor facilidad (Waxman *et al*, 2004).

Otro factor que suele afectar al Vd, y como se mencionó en etapas previas (*vide supra*) es la unión del ATM a proteínas plasmáticas. En un recién nacido la cantidad absoluta de

albúmina en plasma es baja y conforme el animal crece, dicha cantidad se va incrementando, por lo tanto en un neonato habrá una mayor cantidad de fármaco libre con capacidad de difundir a sitios extravasculares, explicándose desde este punto de vista, un mayor Vd en la edad temprana (Baggot, 2001; Balboa de Paz y Rueda, 2004). Tohamy (2011) ha informado que la CFQ se une cerca del 8, 12 y 13 % en ovinos de 30 días, 60 días y un año de edad, respectivamente; además como se mencionara anteriormente, no suele unirse en mayor proporción en adultos de otras especies, por lo que es probable que este factor haya influenciado poco en la variación de los Vd para los cabritos de esta etapa.

Si bien la $T½\lambda_e$ no es el mejor parámetro para evaluar la influencia de la edad debido a que depende de otras variables (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c). Está claro que existen diferencias significativas entre las edades más tempranas (cabritos de 3 y 10 días, con valores de $T½\lambda_e$ de 2,12 ± 0,42 y 2,08 ± 0,44 h, respectivamente) con las más avanzadas (24, 50 y 80 días con $T½\lambda_e$ de 1,34 ± 0,05; 1,14 ± 0,11 y 1,12 ± 0,10 h, respectivamente). En la figura 23 se observan dichas diferencias ($p < 0,05$) así como la tendencia de la $T½\lambda_e$ en función de la edad. El mismo efecto se puede observar en el TMR (2,50 ± 0,41; 2,36 ± 0,23; 1,56 ± 0,28; 1,38 ± 0,16 y 1,34 ± 0,11 h para cabritos de 3, 10, 24, 50 y 80 días, respectivamente; figura 27).

Debido a que la $T½\lambda_e$ y el TMR dependen del Cl, existe una lógica en la relación registrada entre dichos parámetros. En la figura 30 se puede ver como continúan existiendo diferencias significativas, esta vez en el Cl, entre los grupos de 3 y 10 días (146,32 ± 12,25 y 164,49 ± 10,85 ml·kg/h, respectivamente) con los de 24, 50 y 80 días (233,06 ± 29,32; 218,6 ± 13,94 y 229,87 ± 33,36 ml·kg/h, respectivamente) y cuya tendencia es que el Cl se incremente conforme pasa el tiempo. Los trabajos de Tohamy (2011) y Smiet *et al* (2012) con CFQ en ovinos y equinos, respectivamente, también evidencian estas relaciones en la eliminación en función de la edad del animal.

Relacionado a lo anterior, al estar disminuido el Cl en los individuos más jóvenes, se registran unos valores de ABC mayores en los cabritos de 3 y 10 días (13,75 ± 1,14 y 12,21 ± 0,85 µg·h/ml, respectivamente), en relación con los cabritos de 24, 50 y 80 días (8,70 ± 1,09; 9,18 ± 0,58 y 8,85 ± 1,26 µg·h/ml), con diferencias significativas entre estos dos grupos etarios (figura 25). Esta relación en el ABC en función de la edad es similar a la informada por Smiet *et al* (2012), quienes trabajaron con CFQ en equinos de 7 y 42 días, y lo mismo para el caso de otros betalactámicos (Ensink *et al*, 1994).

En síntesis, los datos farmacocinéticos relacionados a la cantidad de fármaco en el organismo (ABC) y la eliminación de CFQ (Cl, $T½\lambda_e$ y TMR) en los cabritos de la etapa IV,

revelan una mayor persistencia significativa del ATM en las edades de 3 y 10 días respecto al resto. Esto se debería a los cambios que existen durante el desarrollo sobre la maduración de los órganos relacionados a la eliminación (Paap y Nahata, 1990; Schwark, 1992; Baggot, 2001; Balboa de Paz y Rueda, 2004; Pacifici, 2011). Teniendo en cuenta que la CFQ se excreta por orina, fundamentalmente por mecanismos de secreción renal y sin metabolización previa, dichos cambios estarían mayormente relacionados con la maduración del riñón.

La funcionalidad renal es incompleta en la mayoría de los animales al momento del nacimiento y, según Baggot (2001), en las especies rumiantes parece ser completa entre la primera y segunda semana de vida. Por una parte, la filtración glomerular requiere solamente de 2 a 7 días en rumiantes neonatos, necesitando más de 2 semanas en cerdos, perros y humanos (De Backer, 1986; Friis, 1979; Nouws ,1992). Por otro lado, la maduración de la función tubular requiere más tiempo y, por lo tanto, los efectos que ejerce sobre la farmacocinética son más pronunciados que la filtración glomerular. En rumiantes la madurez tubular se alcanza dentro de las 2 a 3 semanas, mientras que en cerdos y perros se requieren 4 a 8 semanas (De Backer, 1986; Friis, 1979; 1983; Nouws, 1992).

Queda claro que los datos aportados por los parámetros de eliminación de CFQ en los cabritos de la etapa IV, son coincidentes con la maduración renal según dicha bibliografía, siendo estos antecedentes el motivo por el cual se seleccionaron seis cabritos a los que se le realizaron ensayos con CFQ a los 3, 10, 24, 50 y 80 días de edad.

Refuerza el hecho del mayor tiempo de permanencia en el organismo en cabritos de 3 y 10 días respecto al resto, el carácter ácido de la CFQ en interacción con el pH urinario. Conforme el cabrito va creciendo el pH de la orina pasa gradualmente de ácido a básico por los cambios en la dieta (Watson *et al*, 1987; Baggot 2001); así en presencia de un pH ácido la CFQ tendrá un predominio no polar con mayor reabsorción tubular, respecto a un pH urinario básico donde hay predominio polar de la CFQ, menor reabsorción y por lo tanto un Cl renal más rápido.

Finalmente estas diferencias, en la cantidad de CFQ y fundamentalmente su tiempo de permanencia en el organismo, entre los grupos de 3 y 10 días, respecto a los de 24, 50 y 80 días, pueden ser beneficiosas desde el punto de vista clínico ya que se pueden incrementar los intervalos de administración de la CFQ en cabritos de hasta 10 días de edad, tal como se verá en el apartado de integración farmacocinética y farmacodinámica.

### V.3.6.- Etapa V: Prevalencia y análisis farmacodinámico en leche

Hasta el momento se discutieron los aspectos farmacocinéticos de la CFQ en las diferentes etapas de vida de una cabra, pero nada se ha comentado acerca de la eficacia de este ATM frente a una determinada cepa bacteriana.

Se optó por evaluar la susceptibilidad de los estáfilococococos coagulasa negativos aislados de la leche porque son los principales patógenos productores de mastitis subclínica en cabras lecheras (Contreras *et al*, 2002; Bergonier *et al*, 2003) y porque producción láctea se está incentivando en la provincia de Córdoba, Argentina, siendo la región norte uno de los lugares donde asienta la mayor cantidad de explotaciones caprinas.

La CFQ resulta una buena alternativa en la terapia de mastitis según lo citado en la bibliografía (Bertocchi *et al*, 2000; Palanivel *et al*, 2005; Russi *et al*, 2008; Kasravi *et al*, 2011; Zonca *et al*, 2011). Uno de los parámetros farmacodinámicos utilizados para evaluar la eficacia antimicrobiana es la concentración inhibitoria mínima en el 50 y 90 % de la población ($CIM_{50}$ y $CIM_{90}$, respectivamente). Para que estos valores en la población objeto de estudio sean representativos, se procedió a evaluar la prevalencia de la infección intramamaria, tanto cuantitativa como espacialmente, en los tambos indicados en la tabla 12 y la figura 8.

Se pudo constatar la existencia de un 13,82 % de casos de mastitis subclínica producidas por ECN en la población caprina del norte cordobés. Tres establecimientos (números 1, 5 y 18) alcanzaron prevalencias entre el 30 y 40 %; otros ocho, prevalencias entre el 10 y 20 %, tres con valores menores al 10 % y los cuatro establecimientos restantes sin aislamientos de ECN (tabla 46). Es de destacar que no existen antecedentes cuantitativos de la patología en la zona, y que el cálculo de la prevalencia constituye un importante punto de partida para realizar el seguimiento de la misma.

De acuerdo a lo citado en las diferentes fuentes bibliográficas (*vide infra*), esperábamos una frecuencia de presentación de casos mayor en la población. Una posible explicación estaría relacionada con la menor cantidad de animales intervinientes en los muestreos de la mitad de los establecimientos visitados, calculada por la fórmula para proporciones en poblaciones finitas (Thrusfield, 2005). La imposibilidad por tomar la cantidad de muestras según dicho cálculo fue debida a la dificultad de buscar los animales en el monte, lugar donde se encontraban en el momento de realizar el muestreo (pese a ello, se pudieron extraer muestras entre un 20 y un 70 % de los animales en ordeño). En los demás establecimientos (9 de 18) el número de cabras que participaron del muestreo fue superior a lo recomendado por dicha la fórmula.

En otras partes del mundo, por lo general se indican prevalencias por infecciones intramamarias subclínicas en cabras, superiores a las descriptas en el presente trabajo. A modo de ejemplo, en 1990 Ryan y Greenwood informaron un 17 % de prevalencia en Australia, en 1996 Boscos *et al* indicaron un 29 % en Grecia; por su parte Contreras *et al* (1999) documentaron un 34,3 % en hatos localizados en Estados Unidos, y ese mismo año Sánchez *et al* reportaron un 22 % de casos en España. Además, en el 2005 se registraron en Bulgaria (Bochev y Russenova) e Italia (Moroni *et al*), prevalencias del 33,5 % y 50 %, respectivamente; cerca del 40 % en Suiza (Schaeren y Maurer, 2006), 44 % en España (Marco *et al*, 2008), 40 % en Tanzania (Swai *et al*, 2008) y un 30,5 % de casos en México (Bazan *et al*, 2009).

Cabe destacar que en muchas de estas investigaciones se incluyen en el cálculo de la prevalencia otros microorganismos además de los ECN (por ejemplo Bochev y Russenova, 2005, determinan una presentación general de mastitis subclínica del 33,5 %, pero sólo el 16 % debida a ECN). Además, algunos de estos trabajos basaron el diagnóstico de la afección mamaria en técnicas indirectas, como el recuento de células somáticas donde pueden encontrarse altos recuentos aún en una cabra libre de infección (Paape y Contreras, 2000); esto evidentemente repercute en una mayor prevalencia.

De todas maneras, pese a estas acotaciones, existen otros factores que podrían estar influyendo en la variabilidad de la prevalencia de mastitis caprina hallada entre tales trabajos y las encontradas en las diferentes explotaciones caprinas de nuestro estudio, como las distintas razas empleadas, la intensificación en la producción (mucho mayor en los países desarrollados, que incrementan el riesgo de presentación de casos), el manejo de los hatos, y las rutinas de ordeño empleadas, fundamentalmente.

La pérdida de producción debida a la infección subclínica es un problema complejo de estimar. Pese a ello, se han encontrado diferencias significativas de pérdidas en la producción de 0,431 kg/día por animal (un 21 % del total producido), entre grupos de cabras con prevalencias mayores y menores al 33 %; en términos económicos las explotaciones caprinas con más del 30% de la infección subclínica pueden perder alrededor de 36 euros por cabra por lactancia (Sánchez *et al*, 1997). Del mismo modo, los animales con recuentos superiores a las 800.000 células somáticas/ml sufrirá una disminución de la producción equivalente a 94 litros por cabra por lactancia (alrededor de 45 euros) (Contreras *et al* 2003).

Según esto las pérdidas productivas por mastitis en los hatos de Córdoba, no serían tan elevadas; sin embargo, aunque la prevalencia es un indicador instantáneo que refleja una frecuencia de casos en un momento determinado sin aportar datos de la evolución del

evento (Thrusfield, 2005), y debido a la característica inaparente de la infección intramamaria, el riesgo de persistencia y diseminación de los agentes se incrementaría, por lo que es de esperarse un mayor número de casos con el paso del tiempo, si no se adoptan medidas de control.

En este contexto la instauración de programas de control y la terapéutica racional con ATMs es una necesidad imperiosa, y la CFQ, según los resultados de esta tesis, es un ATM eficaz en condiciones *in vitro* frente a los ECN aislados de la leche de las cabras del norte cordobés, con unos valores de $CIM_{50}$ < 0,4 µg/ml y $CIM_{90}$ < 0,8 µg/ml.

La relación 2:1 entre la $CIM_{90}$ y la $CIM_{50}$ sugiere que los microorganismos son innatamente sensibles o resistentes cuando están por debajo o por encima de los valores de la CIM, respectivamente, y aun no se han evidenciado cepas de ECN en la región estudiada con mecanismos de resistencia adquirida. El incremento del valor de la razón $CIM_{90}$ / $CIM_{50}$, se relaciona directamente con el desarrollo de mecanismos de resistencias en la población bacteriana (Higgins *et al*, 2000) y es debido al mayor uso del ATM. Este efecto también se puede observar en la figura 22, donde los porcentajes de cepas inhibidas por la CFQ en función de la CIM describen una distribución unimodal, a diferencia de las bimodales (donde se observan subpoblaciones intermedias) concomitantes con la evolución de mecanismos de resistencia (Bywater *et al*, 2006; MacGowan y Wise, 2001).

La información, al presente, de la susceptibilidad de ECN frente a la CFQ es limitada, o nula, particularmente en cabras. Un estudio realizado por San Martín *et al* (2002) en Chile sobre 72 cepas de ECN aislados de infecciones intramamarias bovina, señalaron una $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ con CFQ de 0,25 y 2 µg/ml, respectivamente (rango de inhibiciones de 0,125 a 32 µg/ml); la relación $CIM_{90}$ / $CIM_{50}$ de 8 pone en evidencia el desarrollo de resistencia en bovinos para ECN, a diferencia de nuestros resultados en cabras.

Si bien no se trata de CFQ, existe un trabajo donde se evalúa la eficacia *in vitro* de una cefalosporina de tercera generación, la cefoperazona, en diferentes ECN de hatos caprinos procedentes de Italia (Moroni *et al*, 2005), observándose valores de CIM mayores a los de nuestro trabajo (1,87 µg/ml de $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ frente a *Staphylococcus caprae;* 0,94 µg/ml de $CIM_{50}$ y 3,75 µg/ml de $CIM_{90}$ frente a *Staphylococcus epidermidis*).

Otras investigaciones realizadas en Sudamérica y Europa, evalúan la eficacia *in vitro* de la CFQ frente a diferentes cepas estafilocócicas (en su mayoría *S. aureus*) aislados de la leche bovina. En Chile, en el trabajo citado anteriormente (San Martín *et al*, 2002) se informan valores de $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ de 2 y 16 µg/ml, respectivamente, para cepas de *S. aureus*. En Argentina, en la cuenca central lechera (cerca de Córdoba), Russi *et al* (2008)

indicaron los mismos valores de $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ (para *S. aureus*), que los hallados en este trabajo de tesis para ECN en cabras (0,4 y 0,8 µg/ml, respectivamente). En Francia, para *S. aureus*, coincidieron los valores de la $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ (1 µg/ml) y lo mismo aconteció para especies de *Staphylococcus* no aureus (0,5 µg/ml; Guérin-Faublée *et al*, 2003). En tanto que en Italia sólo se describió la $CIM_{90}$ para *S. aureus* de 0,24 µg/ml (Zonca *et al*, 2011). Además, Limber *et al* (1991) informaron una $CIM_{50}$ de 0,78 µg/ml y una $CIM_{90}$ de 1,56 µg/ml para *S. aureus* aislados de distintas especies animales de varios hospitales europeos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan diferencias en cuanto a los valores de CIM de CFQ frente a especies de *Staphylococcus* aisladas de bovinos y en otras regiones, lo cual pone en evidencia la necesidad de generar datos que sean relevantes en la especie caprina que habita nuestra provincia, muchas veces relegada ante otros sistemas productivos de mayor importancia económica.

### V.3.7.- Integración farmacocinética / farmacodinámica

Debido a la escasa, o nula, información de datos acerca de la CIM de CFQ frente a microorganismos patógenos en cabras, para calcular los diferentes parámetros T > CIM se emplearon las $CIM_{90}$ provenientes de diferentes fuentes bibliográficas, de aquellas bacterias que pudieran causar patologías en la especie caprina (tablas 48, 49 y 50).

La mayoría de las cepas aisladas en los trabajos citados son de bovinos localizados en el continente americano y/o europeo. Las infecciones que producen los patógenos escogidos, son de alta frecuencia de presentación en cabras, tanto a nivel respiratorio (*Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida* y *Klebsiella pneumoniae*), digestivo (diferentes enterobacterias) o inclusive en las hembras, mastitis (discutido previamente) y patologías uterinas (*Arcanobacterium pyogenes*). Las diferentes cepas de *Escherichia coli* de los trabajos mencionados por Böttner *et al* (1995), Deshpande *et al* (2000), Sheldon *et al* (2004) y Thomas *et al* (2006), produjeron infecciones en la mayoría de los sistemas orgánicos, o casos graves septicémicos en animales jóvenes (Thomas *et al*, 2004).

Aquellos casos cuya susceptibilidad bacteriana a la CFQ hayan dado como resultado una CIM superior a 1 µg/ml, se han omitido en el cálculo del parámetro T > CIM, pues el acotado tiempo en que las concentraciones séricas de CFQ en las diferentes etapas permanecen encima de dichas CIM, no justificaban la recomendación del ATM a la dosis ensayada (2 mg/kg). Entre tales casos se encuentran *Pseudomonas* spp ($CIM_{90}$ = 8 µg/ml; Thomas *et al*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* ($CIM_{90}$ = 25 µg/ml; Limbert *et al*, 1991),

*Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus* ($CIM_{90}$ para ambos patógenos superior a los 32 µg/ml; Sheldon *et al*, 2004).

Factores tales como la región geográfica, la especie animal susceptible al patógeno y el momento en el que se realizaron los aislamientos bacterianos, influyen en los resultados obtenidos de una CIM. Por lo tanto, los resultados T > CIM presentados en esta tesis para la mayoría de las etapas son orientativos, y constituyen un importante punto de partida para poder trabajar en un futuro con cepas regionales caprinas, tal como se procedió en la etapa V.

De acuerdo a lo enunciado por Toutain y Lees (2004), en un esquema terapéutico con betalactámicos, al menos un 50 % del intervalo de dosificación debe estar cubierto por una concentración antimicrobiana superior a la CIM. En consecuencia, según esto y los parámetros T > CIM calculados y expuestos en las tablas 48, 49 y 50, se recomiendan los intervalos a los que se debería utilizar la CFQ a la dosis de 2 mg/kg para cada etapa y vía IV o IM (tabla 50).

En general podemos decir que la dosis ensayada de este ATM, se puede utilizar cada 8 a 12 h (vía IV) o 12 a 18 h (vía IM) para patógenos con una CIM comprendida entre 0,12 a 0,25 µg/ml, y de 4 a 8 h (vía IV) o de 6 a 12 h (vía IM) para patógenos con CIM superior a los 0,25 µg/ml y hasta 1 µg/ml. Como la permanencia de la CFQ es mayor en cabras con gestaciones avanzadas y en cabritos de 3 y 10 días, en estas categorías se podría incrementar el intervalo de administración IV hasta las 14, 16 y 18 h, según la CIM que se trate (tabla 50). Cuando la sensibilidad de un patógeno sea menor o igual a los 0,06 µg/ml, se podría llegar a utilizar en cabras 2 mg/kg de CFQ vía IM una vez al día.

Según lo demostrado en las etapas farmacocinéticas correspondientes, esta dosis e intervalos son seguros para emplear en hembras preñadas y en período de lactancia, ya que no pasa hacia el feto y existe un mínimo riesgo que deje residuos en leche (por encima de nuestro límite de cuantificación de 0,037 µg/ml). Estos puntos son importantes a tenerlos en cuenta debido a que una cabra durante toda su vida productiva puede estar gestante o lactante, y no sólo se debe tener en cuenta la leche que se destina a consumo humano, sino a la que la cría toma.

Si bien la vía intravenosa no es la que comúnmente se emplea a campo (más aún a la frecuencia de 4 o 6 horas), hay situaciones donde se justifica su empleo, tal como en los casos de septicemias o enterotoxemias donde se presentan generalmente en cabritos.

Para los casos en los cuales el microorganismo posea una CIM superior a la unidad (µg/ml), sería recomendable incrementar la dosis, teniendo en cuenta que esto es posible

debido a la escasa toxicidad que poseen los betalactámicos. Prueba de ello son las dosis vía IV de CFQ empleada por Limbert *et al* (1991) de 10 mg/kg en vacunos, cerdos y perros (e incluso 20 mg/kg también en perros) sin riesgo alguno de toxicidad. Como contrapartida al respecto, hay que tener en cuenta que el riesgo de que se presenten residuos de CFQ en la leche se incrementa, explicado por el comportamiento cinético de primer orden (*vide supra*) donde la cantidad eliminada es proporcional a aquella que se administra; quedaría por tanto a juico del clínico estudiar la relación de riesgo beneficio en cada caso.

Sería de interés realizar estudios similares a los que aquí se presentan con preparados de CFQ de depósito, vía IM, ya que la frecuencia de administración disminuiría considerablemente, y es un aspecto importante a tener en cuenta en condiciones de campo.

Por otra parte los resultados observados en las cabras de la etapa IIIb, por vía IMM, han superado ampliamente el parámetro T > CIM para un intervalo de administración de 12 h a la dosis de 10 mg/medio mamario ensayada, tanto para los patógenos regionales de la etapa V (60 ± 11 h) como otros que se describen en la bibliografía y que se presentan en la tabla 50. En la misma tabla se observa un T > CIM calculado en las cabras de la etapa IIIb para cepas de *S. aureus* de bovinos (Russi *et al*, 2008) de 60 ± 11 h. Este valor (54 ± 34 h) es similar al que presentan Zonca *et al* (2011) con CFQ administrado en vacas lecheras en forma IMM y para el mismo patógeno.

Debido a que el T > CIM llega en promedio hasta las 60 h, se podría llegar a emplear la CFQ en cabras por vía IMM, tanto para ECN como para otros con menor CIM, a una dosis cinco veces inferior a la que se empleó en nuestro estudio, cada 12 h, y continuar cubriendo al 100 % el tiempo por encima de la CIM.

# *VI.- CONCLUSIONES*

## VI.- CONCLUSIONES

- La cromatografía líquida de alta eficacia resultó una técnica válida para la detección y cuantificación de cefquinoma en suero y leche de origen caprino, con un límite de cuantificación de 0,037 µg/ml, una precisión menor al 10 % y una exactitud entre el 80 y 120 %, en ambos fluidos.
- La cefquinoma a la dosis utilizada en este estudio (2 mg/kg) posee un comportamiento farmacocinético en cabras, similar al descrito para otras cefalosporinas en la misma especie, caracterizado por un rápido aclaramiento (y consecuentemente un corto tiempo de permanencia en el organismo) y un bajo volumen de distribución. Tras su administración intramuscular la biodisponibilidad es elevada (entre el 92 y 94 %).
- El estado de gestación avanzada en cabras provoca un menor aclaramiento de la cefquinoma, en comparación con las no gestantes, lo que se traduce en un mayor tiempo de permanencia. Tras la administración intramuscular, en este estado, la biodisponibilidad no se ve afectada. Tampoco se evidencia paso de este antimicrobiano al feto, por lo que se puede considerar un fármaco seguro para utilizar en fases avanzadas de gestación.
- La lactación en cabras no modifica el comportamiento farmacocinético de la cefquinoma, en comparación con las cabras gestantes o vacías (no gestantes ni lactantes). Tras la administración intravenosa e intramuscular, no se apreciaron niveles detectables en leche, excepto en dos animales y en tomas aisladas.
- La administración intramamaria con el régimen posológico utilizado en este estudio (administración múltiple de cefquinoma cada 12 h a dosis de 10 mg por medio mamario), presenta unos parámetros cinéticos similares al de cefquinoma en vacas, con un tiempo medio de residencia de 4 a 6 horas. Las altas concentraciones alcanzadas en leche permiten el paso desde este medio a la sangre, pudiéndose detectar concentraciones del antimicrobiano en el suero sanguíneo.
- La disposición plasmática de la cefquinoma en cabras se ve influenciada por la edad (o por el desarrollo anatomo-fisiológico) estableciéndose claramente diferencias entre dos grupos etarios: animales mayores o menores de 10 días. El volumen de distribución tiende a disminuir, mientras que el aclaramiento se hace mayor, conforme los cabritos crecen. Consecuentemente la permanencia del fármaco en el organismo se acorta a medida que aumenta la edad, siendo en los cabritos de 80 días similar al de las cabras adultas.
- La prevalencia de mastitis subclínica producidas por estafilococos coagulasa negativos (ECN) en los hatos caprinos del norte de la provincia de Córdoba, Argentina, ha sido

del 13,82 %, inferior a la informada por otros trabajos en diferentes partes del mundo; con una $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ inferior a los 0,4 y 0,8 µg/ml, respectivamente, lo que básicamente indica ausencia de desarrollo de mecanismos de resistencia.

- La cefquinoma administrada por vía intramamaria, a la dosis de 10 mg por medio mamario, se encuentra sobre la CIM de los ECN aislados en nuestro trabajo hasta las 60 horas, excediendo en un 100 % el parámetro T > CIM en el intervalo de administración de 12 horas.
- De acuerdo al parámetro de eficacia T > CIM, obtenido para cepas causantes de procesos respiratorios, digestivos, reproductivos y septicémicos, descritos en la bibliografía, la dosis de 2 mg/kg requeriría un intervalo de dosis de 4 horas para cepas con CIM < 1 µg/ml por vía intravenosa, o de 6 horas para la vía IM, pudiéndose incrementar hasta las 12 horas para aquellos patógenos con CIM < 0,125 µg/ml, por vía intravenosa o de 18 horas para la intramuscular.
- Debido a los cambios que origina en el tiempo de permanencia de esta molécula el estado de gestación avanzada, o la menor capacidad de aclaramiento en cabritos recién nacidos de hasta de 10 días de edad, los intervalos de administración que acabamos de describir, son más favorables en estos animales, y podría prolongarse hasta las 18 horas, o incluso hasta las 24 hs, sin pérdida de eficacia clínica para los patógenos más sensibles.

# VII.- RESUMEN

## VII.- RESUMEN

El caprino es una importante fuente de producción de alimentos y cueros, con un constante incremento de su población a nivel mundial, y que se adapta a zonas cuyas condiciones medioambientales no son favorables para la cría en extensivo del tradicional bovino u ovino. Este incremento poblacional, sin un correcto control sanitario, está acompañado por un aumento en las frecuencias de presentación de las enfermedades de etiología bacteriana, entre otras. Debido a ello, el uso de fármacos antimicrobianos constituye una de las herramientas fundamentales para su control.

Sin embargo, y en comparación con otras especies, existen pocos estudios farmacocinéticos (FC) / farmacodinámicos (FD) de estos medicamentos que permitan hacer un uso racional. Por otra parte, teniendo en cuenta uno de los componentes de la relación FC / FD, es necesario conocer el modo en que los diferentes estados fisiológicos influyen sobre el comportamiento cinético de los mismos.

La cefquinoma (CFQ) es una cefalosporina de cuarta generación de uso veterinario, con un amplio espectro de actividad antibacteriana y resistente a las betalactamasas, un factor substancial limitante a la terapéutica con cefalosporinas de generaciones anteriores.

Nuestro objetivo fue evaluar la FC de la CFQ en cabras en distintos estados fisiológicos (vacías, gestantes y en lactación) y en cabritos a diferentes edades, y por otro lado determinar la CIM de este antimicrobiano frente a estafilococos coagulasa negativos (ECN) por ser unos patógenos de amplia presentación en las mastitis caprinas. A fin de poder establecer los parámetros de eficacia antimicrobiana T > CIM que permitan fundamentar pautas posológicas determinadas para cada categoría animal.

Para ello se dividió el trabajo en cinco etapas. En la etapa I se estudió la FC de la CFQ en cabras adultas no gestantes ni lactantes (vías IV e IM; 2 mg/kg). En etapa II se siguió la misma pauta pero en cabras gestantes y se evaluó también el paso de la CFQ a través de placenta, mientras que en la etapa III se emplearon animales en lactación ampliando el estudio con administraciones intramamarias (IMM). La etapa IV se realizó en cabritos a diferentes edades, y por último en la etapa V, se llevo a cabo el aislamiento e identificación de ECN en mastitis subclínicas caprinas y la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CFQ.

Las muestras de los diferentes fluidos biológicos para cuantificar la CFQ, fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia, previa validación del método (límite de cuantificación 0,037 µg/ml). Los aislamientos bacterianos y determinación de la CIM se realizaron con metodologías estandarizadas. Se realizaron estudios de FC con modelos

no compartimentales y estudios estadísticos con test paramétricos y/o no paramétricos (de acuerdo al caso) ($p < 0,05$). Además de la CIM calculada para ECN en leche, se emplearon valores de CIM procedentes de la bibliografía para patógenos habituales en cabras. Se realizaron estudios FC / FD, utilizando como referencia un T > CIM del 50 % entre intervalos de administración.

Los resultados muestran que la CFQ posee un perfil de concentración en el tiempo en cabras adultas vacías similar a otras cefalosporinas, con un $ABC_{\infty}$ = 8,02 ± 0,63 µg·h/ml, $Vd_{ss}$ = 377,35 ± 37,75 ml/kg, Cl = 250,54 ± 19,31 ml·kg/h, $T½\lambda_e$ = 1,61 ± 0,41 h y TMR = 1,51 ± 0,15 h, parámetros válidos para la vía IV. En tanto que la biodisponibilidad luego de la vía IM fue del 94,02 ± 1,37 %. En líneas generales, el comportamiento cinético de la CFQ en cabras lactantes y en cabritos con 24, 50 y 80 días fue similar, siendo más lenta la eliminación en las cabras gestantes y en los cabritos con 3 y 10 días de edad. El paso de la CFQ desde la leche a la sangre fue limitado, casi imperceptible de sangre a leche y nulo desde la madre al feto.

La $CIM_{50}$ y $CIM_{90}$ de CFQ para ECN regionales es inferior a los 0,4 y 0,8 µg/ml, con una prevalencia de infección cercana al 14%. La CFQ administrada en forma IMM se encuentra sobre estos valores de CIM, hasta las 60 h luego de la última administración, indicando que excede en un 100 % el parámetro T > CIM en el intervalo de administración de 12 horas.

De acuerdo al parámetro de eficacia T > CIM, obtenido para cepas causantes de procesos respiratorios, digestivos, reproductivos y septicémicos, cuyas CIM están descritas en la bibliografía, la dosis de 2 mg/kg requeriría un intervalo de administración de 4 h para cepas con CIM < 1 µg/ml por vía IV, o de 6 horas para la vía IM, pudiéndose incrementar hasta las 12 h para aquellos patógenos con CIM < 0,125 µg/ml, por vía IV o de 18 horas para la IM; en tanto que para las cabras con gestaciones avanzadas y en cabritos recién nacidos de hasta de 10 días de edad, se pueden ampliar los intervalos de administración.

**SUMMARY**

The goat is an important source of food production and leather, with a constant increase of the population worldwide, and that adapts to areas whose environmental conditions are not favorable for the breeding of the traditional extensive cattle or sheep. This increasing population, without a correct sanitary control, is followed by an increase in the frequency of presentation of bacterial diseases, amongst others. As a result, the use of antimicrobials drugs is one of the fundamental tools to control them.

However, compared with other species, few studies pharmacokinetic (PK) / pharmacodynamic (PD) of these drugs that allow rational use. Moreover, taking into account one of the components of the PK / PD relationship, it is necessary to know how the different physiological states influence the kinetic behavior of the same.

Cefquinome (CFQ) is a fourth-generation cephalosporin veterinary use, with a wide spectrum of antibacterial activity and beta-lactamase resistant, a substantial factor limiting the therapeutic previous generation cephalosporins.

Our objective was evaluate the PK of the CFQ in goats at different physiological states (nonlactating - nonpregnant, pregnant and lactating) and kids of different ages and otherwise to determine the MIC of this antimicrobial against coagulase-negative staphylococci (CNS) due of its frequent presentation in goat mastitis. In order to establish the antimicrobial efficacy parameters T > MIC regimens, that provide a basis determined for each animal category.

This work was divided into five stages. In stage I, we studied PK of CFQ in nonpregnant - nonlactating goats (IV and IM routes, 2 mg/kg). In stage II followed the same regimen but in pregnant goats and also evaluated the passage of CFQ through the placenta, whereas in stage III lactating animals were used to expand the study with administrations intramammary (IMM). Stage IV was performed on kids at different ages, and finally in stage V, we proceeded to the isolation and identification of CNS in subclinical mastitis goats and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of CFQ.

Samples of different biological fluids for quantifying CFQ were analyzed by high performance liquid chromatography, following validation of the method (limit of quantification 0.037 ug / ml). The bacterial isolates and MIC determination were performed using standardized methodologies. PK studies were performed with non-compartmental models and statistical parametric tests and / or nonparametric (according to case) ($p < 0.05$). In addition to estimating MIC of CNS in milk, MIC values were used from the

literature for common pathogens in goats. Studies were conducted PK / PD, using as reference a T > MIC of 50% between intervals of administration.

Results show that CFQ has a concentration profile over time in nonpregnant - nonlactating goats like other cephalosporins, with an AUC ∞ = 8.02 ± 0.63 µg·h/ml, $Vd_{ss}$ = 377.35 ± 37.75 ml/kg, Cl = 250.54 ± 19.31 ml·kg/h, $T½\lambda_e$ = 1.61 ± 0,41 h and mrt = 1,51 ± 0.15 h, parameters for the IV. While the bioavailability after IM injection was 94.02 ± 1.37%. In general, kinetic behavior CFQ in lactating goats and kids with 24, 50 and 80 days was similar, with slower elimination in pregnant goats and kids with 3 and 10 days old. Passage of CFQ from milk to blood was limited, almost imperceptible from blood to milk and null from mother to fetus.

$MIC_{50}$ and $MIC_{90}$ of CFQ for regional CNS are below 0.4 and 0.8 µg /ml, with a prevalence of about 14%. CFQ administered IMM is on these MIC values, up to 60 h after the last administration, indicating that exceeds 100% the parameter T > MIC in the range of 12 hours of administration.

According to the efficacy parameter T > MIC obtained for strains cause respiratory, gastrointestinal, reproductive and septicemic, whose MIC are described in the literature, the dose of 2 mg/kg administration require an interval of 4 h for strains with MIC < 1 µg/ml by IV, or 6 h for IM, and can be increased to 12 h for those pathogens with MIC < 0.125 µg/ml by IV or for 18 h by IM route. While for goats with advanced pregnancies and newborn kids until 10 days old, can be extended administration intervals.

# VIII.- BIBLIOGRAFÍA

## VIII.- BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup, F.M.; Hasman, H.; Veldman, K.; Mevius, D. (2010). Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. Microb Drug Resist. 16 (4): 253 - 261.

Adamson, P. J.; Wilson, W. D.; Baggot, J. D.; Hietala, S. K.; Mihalyi. J. E. (1991). Influence of age on the disposition kinetics of chloramphenicol in equine neonates. Am J Vet Res. 52 (3): 426 - 431.

Ahuja, V.; Ahmad, A.; Singh, K.; Pardeep Kumar; Pranvendra, K. (2009). Pharmacokinetics of cefazolin in healthy and febrile goats and its interaction with diclofenac sodium. Indian J Anim Sci. 79 (6): 541 - 545.

Albarellos, G. A.; Kreil, V. E.; Landoni, M. F. (2007). Pharmacokinetics of ceftriaxone after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to domestic cats. J Vet Pharmacol Ther. 30 (4): 345 - 352.

Al-Bataineh, M. M.; van der Merwe, D.; Schultz, B. D.; Gehring, R. (2009). Cultured mammary epithelial monolayers (BME-UV) express functional organic anion and cation transporters. J Vet Pharmacol Ther. 32 (5): 422 - 428.

Al-Bataineh M. M.; van der Merwe D., Schultz B. D., Gehring, R. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases P-glycoprotein expression in a BME-UV *in vitro* model of mammary epithelial cells. Biopharm Drug Dispos. 31 (8-9): 506 - 515.

Aldridge, K. E. (2002). Comparison of the post-antibiotic effect (PAE) induced by ceftizoxime, ceftriaxone, cefoxitin, ampicillin-sulbactam, and ticarcillin-clavulanate against selected isolates of *Bacteroides fragilis* and *B. thetaiotaomicron*. Anaerobe. 8 (6): 295 - 299.

Al-Taher, A. (2010). Pharmacokinetics of cefquinome in camels. J Anim Vet Adv. 9 (4): 848 - 852.

Ambros, L.; Kreil, V.; Tarragona, L.; Monfrinotti, A.; Hallu, R.; Rebuelto, M. (2011). Comparative pharmacokinetics of intravenous cephalexin in pregnant, lactating, and nonpregnant, nonlactating goats. J Vet Pharmacol Ther. 34 (4): 397 - 402.

Amiridis, G. S.; Fthenakis G. C.; Dafopoulos, J.; Papanikolaou, T.; Mavrogianni, V. S. (2003). Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis. J Vet Pharmacol Ther. 26 (5): 387 - 390.

Antonić, J.; Grabnar, I.; Milčinski, L.; Skibin, A.; Süssinger, A.; Pogačnik, M.; Cerkvenik-Flajs, V. (2011). Influence of P-glycoprotein inhibition on secretion of ivermectin and doramectin by milk in lactating sheep. Vet Parasitol. 179 (1-3): 159 - 166.

Aramayona, J. J.; Mora, J.; Fraile, L. J.; García, M. A.; Abadía, A. R., Bregante, M. A. (1996). Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring. Am J Vet Res. 57 (4): 547 - 553.

Arcellonia, C.; Basileb, M.; Vaianib, R.; Boninic, P.; Paroni, R. (1996). Determination of ceftazidime concentration in Mueller Hinton agar by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 742 (1-2): 121 - 126.

Arias, M.; Alonso, A. (2002). Estudio sobre sistemas caprinos del norte de la provincia de Córdoba, Argentina. Arch Zootec. 51 (195): 341 – 349.

Atef, M.; Ramadan, A.; Afifi, N. A.; Youssef, S. A. (1990). Pharmacokinetic profile of cefotaxime in goats. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 97 (8): 324 - 327.

Atef, M.; Youssef, S. A.; Atta, A. H.; el-Maaz, A. A. (1991). Disposition of tylosin in goats. Br Vet J. 147 (3): 207 - 215.

Baggot, J. D. (1977). Principles of drug disposition. *In*: The Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. 1st ed. Saunders. Philadelphia. Pp. 1 - 134.

Baggot, J. D. (2001). The physiological basis of veterinary clinical pharmacology. Blackwell Science. London. Pp. 283.

Baggot, J. D. (2006). Principles of antimicrobial drug bioavailability and disposition. *In*: Giguère, S.; Prescott, J.; Baggot, J.; Walker, R.; Dowling, P. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp. 45 - 79.

Bajwa, N. S.; Bansal, B. K.; Srivastava, A. K.; Ranjan, R. (2007). Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. Vet Res Commun. 31 (5): 603 - 610.

Balboa de Paz, F.; Rueda, E. (2004). Características farmacocinéticas de los fármacos en la edad pediátrica. Actualidad en Farmacología y Terapéutica. 2 (2): 89 - 98.

Banerjee, N. C.; Miller. G. E.; Stowe, C. M. (1967). Excretion of aminopyrine and its metabolites into cow's milk. Toxicol Appl Pharmacol. 10 (3): 604 - 612.

Barbeito, C. G. (2008). Historia de las placentas y su relación con la morfología. Ciencias Morfológicas. 10 (2): 1 - 15.

Baroni, E. E.; Díaz, D. C.; Picco, E.; Waxman, S.; Rodríguez, C.; San Andrés, M. I.; Boggio, J. C. (2008). Effects of age on the pharmacokinetics of single dose sulfamethazine after intravenous administration in cattle. Vet Res Commun. 32 (7): 509 - 519.

Barza, M.; Lynch, E.; Baum, J. L. (1993). Pharmacokinetics of newer cephalosporins after subconjunctival and intravitreal injection in rabbits. Arch Ophthalmol. 111 (1): 121 - 125.

Bazan, R.; Cervantes, E.; Salas, G.; Segura Correa, J. C. (2009). Prevalencia de mastitis subclínica en cabras lecheras en Michoacán, México. Rev Cient. 19 (4): 334 - 338.

Bedotti, D.; Sánchez Rodríguez, M. (2004). Aproximación a la problemática sanitaria del ganado caprino en el oeste pampeano. Investigación en producción animal 2002-2003, región subhúmeda y semiárida pampeana. Boletín de divulgación técnica INTA Anguil. 79: 120 - 129.

Bengtsson, B.; Jacobsson, S. O.; Luthman, J.; Franklin, A. (1997). Pharmacokinetics of penicillin G in ewes and cows in late pregnancy and in early lactation. J Vet Pharmacol Ther. 20 (4): 258 - 261.

Bergogne-Bérézin, E.; Bryskier, A.; Berthelot, G.; Ravina, J. H.; Vernant, D. (1985). Placental transfer of cefmenoxime in late pregnancy. Chemotherapy. 31 (1): 1 - 5.

Bergogne-Berezin, E., Morel, C., Benard, Y.; Berthelot, G.; Kafe, H. (1978). Pharmacokinetic study of beta-lactam antibiotics in bronchial secretions. Scand J Infect Dis Suppl. (14): 267 - 272.

Bergold, A. M. (2007). Development of a microbiological assay to determine the potency of ceftiofur sodium powder. J AOAC Int. 90 (6): 1724 - 1728.

Bergonier, D.; de Cremoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res. 34 (5): 689 - 716.

Berthelot, G.; Bornet, M.; Bergogne-Bérézin, E.; Ravina, J. H. (1988). Placental passage of cefodizime. Pathol Biol. 36 (5 pt 2): 699 - 701.

Bertocchi, L.; Roncada, P.; Greppi, G. F.; Bravo, R.; Belloli, A. (2000). Efficacia di cefquinome nel trattamento delle mastiti da *Staphilococcus aureus* nel bovino. Large Anim Rev. 6 (4): 31 - 34.

Bidgood, T.; Papich, M. G. (2002). Plasma pharmacokinetics and tissue fluid concentrations of meropenem after intravenous and subcutaneous administration in dogs. Am J Vet Res. 63 (12): 1622 - 1628.

Block, C. von; Wanner, M.; Heinritzi, K. (2005). Pharmacokinetics of cephalosporin, Cefquinome, in sows at different reproduction phases. Terra-Verlag GmbH Konstanz, Germany, Tierärztliche Umschau. 60 (3) 137 - 145.

Bochev, I.; Russenova, N. (2005). Resistance of *Staphylococcus spp* strains isolated from goats with subclinical mastitis. Bulg J Vet Sci. 8 (2): 109 - 118.

Boerlin, P.; White, D. G. (2006). Antimicrobial resistance and its epidemiology. *In*: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4$^{th}$ ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp. 22 - 43.

Bonnin, P.; Huynh, L.; L'Haridon, R.; Chene, N.; Martal, J. (1999). Transport of uterine PGF2 alpha to the ovaries by systemic circulation and local lymphovenous-arterial diffusion during luteolysis in sheep. J Reprod Fertil. 116 (1): 199 - 210.

Boscos, C.; Stefanakis, A.; Alexopoulos, C.; Samartzi, F. (1996). Prevalence of subclinical mastitis and influence of breed, parity, stage of lactation and mammary bacteriological status on Coulter Counter Counts and California Mastitis Test in the milk of Saanen and autochthonous Greek goats. Small Rumin Res. 21 (2): 139 - 147.

Böttner, A.; Schmid, P.; Humke, R. (1995). *In vitro* efficacy of cefquinome (INN) and other anti-infective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and the United Kingdom. Zentralbl Veterinarmed B. 42 (6): 377 - 383.

Brace, R. A. (1995). Progress toward understanding the regulation of amniotic fluid volume: water and solute fluxes in and through the fetal membranes. Placenta. 16 (1): 1 - 18.

Bradley, A. J.; Breen, J. E.; Payne, B.; Green, M. J. (2011). A comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. J Dairy Sci. 94 (2): 692 - 704.

Brown, K. N.; Percival, A. (1978). Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. Scand J Infect Dis Suppl. (14): 251 - 260.

Brown M. P.; Gronwall, R. R.; Houston, A. E. (1986). Pharmacokinetics and body fluid and endometrial concentrations of cefoxitin in mares. Am J Vet Res. 47 (8): 1734 - 1738.

Brown, M. P.; Gronwall, R. R.; Pattio, N.; Poulos, P. W.; Houston, A. E. (1991). Pharmacokinetics and synovial fluid concentrations of cephapirin in calves with suppurative arthritis. Am J Vet Res. 52 (9): 1438 - 1440.

Brown, S. A.; Chester, S. T.; Robb, E. J. (1996). Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. J Vet Pharmacol Ther. 19 (1): 32 - 38.

Brown, M. P.; Gronwall, R.; Gossman, T. B.; Houston, A. E. (1987). Pharmacokinetics and serum concentrations of cephapirin in neonatal foals. Am J Vet Res. 48 (5): 805 - 806.

Burrows, G. E.; Barto, P. B.; Martin, B.; Tripp, M. L. (1983). Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin, and tylosin. Am J Vet Res. 44 (6): 1053 - 1057.

Bywater, R.; Silley, P.; Simjee, S. (2006). Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements. Vet Microbiol. 118 (1-2): 158 - 159.

Cagnardi, P.; Villa, R.; Gallo, M.; Locatelli, C.; Carli, S., Moroni, P., Zonca, A. (2010). Cefoperazone sodium preparation behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. J Dairy Sci. 93 (9): 4105 - 4110.

Campbell, B. G.; Rosin, E. (1998). Effect of food on absorption of cefadroxil and cephalexin in dogs. J Vet Pharmacol Ther. 21 (5): 418 - 420.

Carli, S.; Anfossi, P.; Villa, R.; Castellani, G.; Mengozzi, G.; Montesissa, C. (1999). Absorption kinetics and bioavailability of cephalexin in the dog after oral and intramuscular administration. J Vet Pharmacol Ther. 22 (5): 308 - 313.

Cavaco, L. M.; Abatih, E.; Aarestrup, F. M.; Guardabassi, L. (2008). Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. Antimicrob Agents Chemother. 52 (10): 3612 - 3616.

Ceckova-Novotna, M.; Pavek, P.; Staud, F. (2006). P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. Reprod Toxicol. 22 (3): 400 - 410.

Cester, C.C.; Schneider, M.; Toutain, P.L. (1996). Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: enrofloxacin *versus* marbofloxacin. Revue de Médicine Vétérinaire. 147: 703 - 716.

Chicoine, A. L.; Boison, J. O.; Parker, S.; Clark, C.; Dowling, P. M. (2009). Kinetics and residues after intraperitoneal procaine penicillin G administration in lactating dairy cows. J Vet Pharmacol Ther. 32 (3): 289 - 295.

Clarke, C. R.; Lochner, F. K.; Bellamy, J. (1992). Pharmacokinetics of gentamicin and antipyrine in the horse--effect of advancing age. J Vet Pharmacol Ther. 15 (3): 309 - 313.

CLSI / NCCLS. (2002) National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. 2nd ed. NCCLS document M31-A2. Pp. 86. Wayne, Pennsylvania, USA.

Contreras, A.; Luengo, C.; Sánchez, A.; Corrales, J. C. (2003). The role of intramammary pathogens in dairy goats. Livest Sci. 79 : 273 - 283.

Contreras, A.; Paape, M. J.; Millerb, R. H. (1999). Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. Small Rumin Res. 31: 203 - 208.

Cooper, W. O., Hickson, G. B.; Ray, W. A. (2004). Prescriptions for contraindicated category X drugs in pregnancy among women enrolled in TennCare. Paediatr Perinat Epidemiol. 18 (2): 106 - 111.

Corrales, J. C.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Luengo, C.; Marco, J. C. (1997). Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. Ovis. 53: 33 - 65.

Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 26 (1): 1 - 10.

Crisman, M. V.; Wilcke, J. R.; Correll, L. S.; Irby, M. H. (1993). Pharmacokinetic disposition of intravenous and oral pentoxifylline in horses. J Vet Pharmacol Ther. 16 (1): 23 - 31.

Da Silveira, L.; Schapoval, E. (2002). Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. J Pharm Biomed Anal. 27 (1-2): 91 - 96.

Daly, R. C.; Fitzgerald, R. H. Jr., Washington, J. A. (1982). Penetration of cefazolin into normal and osteomyelitic canine cortical bone. Antimicrob Agents Chemother. 22 (3): 461 – 469.

Davis, J. L.; Salmon, J. H.; Papich, M. G. (2005). Pharmacokinetics and tissue fluid distribution of cephalexin in the horse after oral and i.v. administration. J Vet Pharmacol Ther. 28 (5): 425 - 431.

Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S.; Wood Jr., B. W. (1968). Principles of Microbiology and Immunology. Harper & Row, New York.

Dawes, M.; Chowienczyk, P. J. (2001). Pharmacokinetics in pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 15 (6): 819 - 826.

De Backer, P. (1986). Comparative Neonatal Pharmacokinetics. *In*: Van Miert, A.S.; Bogaert, M.G. y Debackere, M.. Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy. Proc. 3º Congr. Europ. Assoc. Vet. Pharmacol. Toxicol. August 25-29. Belgium. MTP Press Ltd lancaster. United Kingdom.

Deshpande, L.; Pfaller, M. A.; Jones, R. N. (2000). *In vitro* activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum beta-lactamase producing strains. Int J Antimicrob Agents. 15 (4): 271 - 275.

Deurenberg, R. H.; Vink, C.; Kalenic, S.; Friedrich, A. W.; Bruggeman, C. A.; Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 13 (3): 222 - 235.

Doré, E.; Angelos, J. A.; Rowe, J. D.; Carlson, J. L.; Wetzlich, S. E.; Kieu, H. T.; Tell, L. A. (2011). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline free acid after single subcutaneous administration in lactating and nonlactating domestic goats (*Capra aegagrus hircus*). J Vet Pharmacol Ther. 34 (1): 25 - 30.

Dowling, P.; Kruth, S. (2006). Antimicrobial therapy of Selected Organ System. *In*: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 357 - 379.

Duffee, N. E.; Stang, B. E.; Schaeffer, D. J. (1997). The pharmacokinetics of cefadroxil over a range of oral doses and animal ages in the foal. J Vet Pharmacol Ther. 20 (6): 427 - 433.

Duffee, N. E.; Christensen, J. M.; Craig, A. M. (1989). The pharmacokinetics of cefadroxil in the foal. J Vet Pharmacol Ther. 12 (3): 322 – 326.

Dunlop, R. (1983). Ruminal influence on drug action. *In*: Ruckebusch, Y.; Toutain, P.; Koritz, G.. Veterinary pharmacology and toxicology. MTP Press Limited. Lancaster. Pp. 165 - 181.

Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing, C. J. (2007). Anatomía veterinaria. 3ª ed. Manual Moderno. México, D.F. Pp 920.

Edwards, J. E.; Alcorn, J.; Savolainen, J.; Anderson, B. D.; McNamara, P. J. (2005). Role of P-glycoprotein in distribution of nelfinavir across the blood-mammary tissue barrier and blood-brain barrier. Antimicrob Agents Chemother. 49 (4): 1626 - 1628.

Egan, J.; Meaney, W. J. (1985). Persistence of detectable residues of penicillin and cloxacillin in normal and mastitic quarters following intramammary infusion. Vet Rec. 116 (16): 436 - 438.

Ehinger, A. M.; Schmidt, H.; Kietzmann, M. (2006). Tissue distribution of cefquinome after intramammary and "systemic" administration in the isolated perfused bovine udder. Vet J. 172 (1): 147 - 153.

El-Gendy, A.; Tohamy, M.; Abeer, M. Radi. (2009). Pharmacokinetic profile and some pharmacodynamic aspects of cefquinome in chickens. Beni Suef Vet Med J. 2009. 19 (2): 33 - 37.

El-Sooud, K. A.; El-Banna, H. A.; Hanafy, M. S.; Goudah, A. (2000). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of cefuroxime sodium in goats. Res Vet Sci. 69 (3): 219 - 224.

EMEA. (1995). Cefquinome. EMEA/MRL/005/95.

EMEA, (1998). Cefquinome (extension to pigs). Summary report 1. EMEA/MRL/405/98-FINAL.

EMEA. (1999). Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species. EMEA/CVMP/133/99-FINAL.

EMEA. (2000). Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. EMEA/CVMP/016/00 corr-FINAL.

EMEA. (2003). Cefquinome (extension to horses). Summary report 3. EMEA/MRL/883/03-FINAL.

EMEA. (2008). Reflection paper on the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. EMEA/CVMP/SAGAM/81730/06-CONSULTATION.

EMEA. (2009). Guideline on validation of bioanalytical-methods. EMEA/CHMP/EWP/192217/09.

Ensink, J. M.; Barneveld, A.; Klein, W. R.; van Miert, A. S.; Vulto, A. G. (1994). Oral bioavailability of pivampicillin in foals at different ages. Vet Q. 16 (sup2): 113 - 116.

Ensminger, M. E.; Parker R. O. (1986). Sheep and Goat Science. The Interstate Printers and Publishers Inc. Danville, Illinois. Pp. 643.

Errecalde, C.; Prietto, G.; Lüders, C. (2007). Cefalosporinas. *En*: San Andres M, Boggio JC. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Intermédica. Buenos Aires. Pp. 105 - 117.

Errecalde, C. A.; Prieto, G. F.; Puelles, I.; Lüders, C. F.; García Ovando, H. (2001). Disposición plasmática de cefquinome en caprinos por administración intramuscular. InVet. 3 (1-2): 89 - 94.

Errecalde, C. A.; Prieto, G. F.; Puelles, I.; Lüders, C. F.; García Ovando, H. (2002). Farmacocinética de cefquinome en terneros por aplicación intramuscular. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 15 (3): 281 - 285.

Erskine, R. J; Bartlett, P. C.; Johnson, G. L. 2nd; Halbert, L. W. (1996). Intramuscular administration of ceftiofur sodium *versus* intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 208 (2): 258 - 260.

Erskine, R. J.; Wilson, R. C.; Tyler, J. W.; McClure, K. A.; Nelson, R. S.; Spears, H. J. (1995). Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental *Escherichia coli* - induced mastitis. Am J Vet Res. 56 (4): 481 - 485.

EudraLex Volume 8. (2005). Notice to applicants and Guideline Veterinary medicinal products. The rules governing medicinal products in the European Union.

FAOSTAT. (2012). Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor. Consulta: 12 agosto 2012.

Farrier, D. (1997). PK Solutions. Non Compartmental Pharmacokinetics Data Analysis. User Guide. Summit Research Services. Ashland, OH, USA. Pp. 50.

Fleishaker, J. C.; Desai, N.; McNamara, P. J. (1989). Possible effect of lactational period on the milk-to-plasma drug concentration ratio in lactating women: results of an *in vitro* evaluation. J Pharm Sci. 78 (2): 137 - 141.

Forrest, A.; Nix, D. E.; Ballow, C. H.; Goss, T. F.; Birmingham, M. C.; Schentag, J. J. (1993). Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. Antimicrob Agents Chemother. 37 (5): 1073 - 1081.

Fortunato, S. J; Bawdon, R. E.; Welt, S. I.; Swan, K. F. (1988). Steady-state cord and amniotic fluid ceftizoxime levels continuously surpass maternal levels. Am J Obstet Gynecol. 159 (3): 570 - 573.

Frank, L. A.; Kunkle, G. A. (1993). Comparison of the efficacy of cefadroxil and generic and proprietary cephalexin in the treatment of pyoderma in dogs. J Am Vet Med Assoc. 203 (4): 530 - 533.

Freitas, V. J.; Rondina, D.; Lopes, E. S. Jr.; Teixeira, D. I.; Paula, N. R. (2004). Hormonal treatments for the synchronisation of oestrus in dairy goats raised in the tropics. Reprod Fertil Dev. 16 (4): 415 - 420.

Friis, C. (1979). Postnatal development of renal function in piglets: glomerular filtration rate, clearance of PAH and PAH extraction. Biol Neonate. 35 (3-4): 180 - 187.

Fromm, M. F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends Pharmacol Sci. 25 (8): 423 - 429.

Fung-Tomc, J. C. (1997). Fourth-Generation Cephalosporins. Clin Microbiol Newsl. 19 (17): 129 - 136.

Gallo Martínez, L.; Campíns Falcó, P.; Sevillano Cabeza, A. (2002). Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. J Pharm Biomed Anal. 29 (3): 405 - 423.

Ganière, J. P.; Mangion, C.; Péridy, M. (2004). Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. Revue de Médecine Vétérinaire. 155 (8-9): 411 - 416.

Ganière, J. P.; Medaille, C.; Mangion, C. (2005). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 52 (1): 25 - 31.

Gedeon, C.; Behravan, J.; Koren, G.; Piquette-Miller, M. (2006). Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure. Placenta. 27 (11-12): 1096 - 1102.

Gehring, R.; Smith, G. W. (2006). An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. J Vet Pharmacol Ther. 29 (4): 237 - 241.

GLP. (2004) . Directive of the European Parliament and of the Council. 2004/9/EC. 11 February. The inspection and verification of good laboratory practice.

Golenz, M. R.; Wilson, W. D.; Carlson, G. P.; Craychee, T. J.; Mihalyi, J. E.; Knox, L. (1994). Effect of route of administration and age on the pharmacokinetics of amikacin administered by the intravenous and intraosseous routes to 3 and 5-day-old foals. Equine Vet J. 26 (5): 367 - 373.

Gómez Ruiz, M. L.; Montalvo Montes, J. (2006). Líquido Amniótico. *En*: Govantes Betes, J; Lorenzo Velázquez, P; Govantes Esteso, C.. Manual Normon. 8ª ed. Laboratorios Normon. Madrid. Pp 1318.

Guérin-Faublée, V.; Carret, G.; Houffschmitt, P. (2003). *In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. Vet Rec. 152 (15): 466 – 471.

Guérin-Faublée, V.; Tardy, F.; Bouveron, C.; Carret, G. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. Int J Antimicrob Agents. 19 (3): 219 - 226.

Guerra, F. L.; Paim, C. S.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. (2005). Biological assay and liquid chromatographic method for analysis of moxifloxacin in tablets. J AOAC Int. 88 (4): 1086 - 1092.

Guerrini, V. H.; Filippich, L. J.; Cao, G. R.; English, P. B.; Bourne, D. W. (1985). Pharmacokinetics of cefaronide, ceftriaxone and cefoperazone in sheep. J Vet Pharmacol Ther. 8 (2): 120 - 127.

Güertler, H.; Kolb, E.; Esaín Escobar, J. (1987). Fisiología veterinaria, 2ª ed. Acribia, Zaragoza. Vol 1. Pp. 570

Gyrd-Hansen, N.; Friis, C.; Nielsen, P.; Rasmussen, F. (1984). Metabolism of trimethoprim in neonatal and young pigs: comparative *in vivo* and *in vitro* studies. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 55 (5): 402 - 409.

Hafez, S. A.; Borowicz, P.; Reynolds, L. P.; Redmer, D. A. (2010). Maternal and fetal microvasculature in sheep placenta at several stages of gestation. J Anat. 216 (3): 292 - 300.

Heikkilä. A.; Pyykkö, K.; Erkkola, R.; Iisalo, E. (1992a). The pharmacokinetics of mecillinam and pivmecillinam in pregnant and non-pregnant women. Br J Clin Pharmacol. 33 (6): 629 - 633.

Heikkilä, A.; Renkonen, O. V.; Erkkola, R. (1992b). Pharmacokinetics and transplacental passage of imipenem during pregnancy. Antimicrob Agents Chemother. 36 (12): 2652 - 2655.

Heikkinen, T.; Laine, K.; Neuvonen, P.J.; Ekblad, U. (2000). The transplacental transfer of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin and azithromycin. Br J Obstet Gynaecol. 107 (6): 770 - 775.

Higgins, P. G.; Coleman, K.; Amyes, S. G. (2000). Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter spp in vitro*. J Antimicrob Chemother. 45 (Suppl 1): 71 - 77.

Holt, D. E.; Broadbent, M.; Spencer, J. A.; de Louvois, J.; Hurley, R.; Harvey, D. (1994). The placental transfer of cefuroxime at parturition. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 54 (3): 177 - 180.

Hornish, R. E.; Kotarski, S. F. (2002). Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. Curr Top Med Chem. 2 (7): 717 - 731.

Ibrahim, K. H.; Hovde, L. B; Ross, G.; Gunderson, B.; Wright, D. H.; Rotschafer, J. C. (2002). Microbiologic effectiveness of time- or concentration- based dosing strategies in *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 44 (3): 265 - 271.

Idowu, O. R.; Peggins, J. O.; Cullison, R.; Bredow, J. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. Res Vet Sci. 89 (2): 230 - 235.

Igarza, L.; Soraci, A.; Auza, N.; Zeballos, H. (2002). Chiral inversion of (R)-ketoprofen: influence of age and differing physiological status in dairy cattle. Vet Res Commun. 26 (1): 29 - 37.

Igwebuike, U. M. (2006). Trophoblast cells of ruminant placentas - A minireview. Anim Reprod Sci. 93 (3-4): 185 - 198.

Ismail, M. M. (2005). Pharmacokinetics, urinary and mammary excretion of ceftriaxone in lactating goats. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 52 (7): 354 - 358.

Ito, S.; Lee, A. (2003). Drug excretion into breast milk: overview. Adv Drug Deliv Rev. 55 (5): 617 - 627.

Jacobs, M. H. (1940). Some aspects of cell permeability to weak to electrolytes. Cold Spring Harb Sym. 8: 30 - 39.

Jacoby, G. A.; Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. N Engl J Med. 352 (4): 380 - 391.

Jones, R. N. (1989). A review of cephalosporin metabolism: a lesson to be learned for future chemotherapy. Diagn Microbiol Infect Dis. 12 (1): 25 - 31.

Jørgensen, N. P.; Walstad, R. A.; Molne, K. (1987). The concentrations of ceftazidime and thiopental in maternal plasma, placental tissue and amniotic fluid in early pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 66 (1): 29 - 33.

Karzis, J.; Donkin, E. F.; Petzer, I. M. (2007). Intramammary antibiotics in dairy goats: withdrawal periods of three intramammary antibiotics compared to recommended withdrawal periods for cows. Onderstepoort J Vet Res.74 (3): 217 - 222.

Kasiakou, S. K.; Lawrence, K. R.; Choulis, N.; Falagas, M. E. (2005). Continuous *versus* intermittent intravenous administration of antibacterials with time-dependent action: a systematic review of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Drugs. 65 (17): 2499 - 2511.

Kasravi, R.; Bolourchi, M.; Farzaneh, N.; Seifi, H. A.; Barin, A.; Hovareshti, P.; Gharagozlou, F. (2011). Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. Trop Anim Health Prod. 43 (6): 1203 - 1210.

Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Mikami, O.; Tamamura, Y.; Uchida, I. (2012). Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle. Vet Microbiol. 155 (2-4): 444 - 447.

Kawalek, J. C.; el Said, K. R. (1994). Comparison of maturation of drug-metabolizing enzymes in calves with functioning or nonfunctioning rumen. Am J Vet Res. 55 (11): 1579 - 1586.

Kinabo, L. D.; McKellar, Q. A. (1989). Current models in pharmacokinetics: applications in veterinary pharmacology. Vet Res Commun. 13 (2): 141 - 157.

Kinoshita, T.; Son, D. S.; Shimoda, M.; Kokue, E. (1995). Impact of age-related alteration of plasma alpha 1-acid glycoprotein concentration on erythromycin pharmacokinetics in pigs. Am J Vet Res. 56 (3): 362 - 365.

Kollef, M. H. (2009). New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Crit Care Resusc. 11 (4): 282 - 286.

Lavy, E.; Shem-Tov, M.; Or-Bach, A.; Ziv, G.; Glickman, A.; Saran, A. (1997). Oral availability and bioequivalence studies in dogs of two cephalexin tablets and a cephalexin capsule. J Vet Pharmacol Ther. 20 (Suppl 1): 63 - 64.

Lees, P. Shojaee Aliabadi, F. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs: animals *versus* humans. Int J Antimicrob Agents. 19 (4): 269 - 284.

Li, X. B.; Wu, W. X.; Su, D.; Wang, Z. J.; Jiang, H. Y.; Shen, J. Z. (2008). Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy piglets. J Vet Pharmacol Ther. 31 (6): 523 - 527.

Li, X. Z.; Mehrotra, M.; Ghimire, S.; Adewoye, L. (2007). Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. Vet Microbiol. 121 (3-4): 197 - 214.

Lima, D. M.; Nunes Júnior, G.; Ferri, P. H.; Santos, S. C. (2005). Determination of fluconazole in serum and amniotic fluid of rats by gas-chromatography/mass spectometry (GC/MS). Rev Bras Ciências Farm. 41 (2): 223 - 227.

Limbert, M.; Isert, D.; Klesel, N.; Markus, A.; Seeger, K.; Seibert, G; Schrinner, E. (1991). Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. Antimicrob Agents Chemother. 35 (1): 14 - 19.

Litterio, N. J.; Calvinho, L. F.; Flores, M. M.; Tarabla, H. D.; Boggio, J. C. (2007). Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 54 (1): 30 - 35.

Lohr, B.; Brunner, B.; Hellmann, K. (2004). Survey about the use of Cobactan®-Suspension 2.5% in animals with relevance for the veterinary practice: cattle. Tierärztliche Umschau. 59 (6): 352 - 355.

Long, P. E.; Heavner, J. E.; Ziv, G.; Geleta, J. N.; Nepote, K. (19884). Depletion of antibiotics from the mammary gland of goats. J Dairy Sci. 67 (3): 707 - 712.

Lorian, V. (1975). Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. Bull N Y Acad Med. 51 (9): 1046 - 1055.

Lucas, M. F.; Errecalde, J. O.; Mestorino, N. (2010). Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J Vet Pharmacol Ther. 33 (2): 132 - 140.

MacGowan, A. P. (2011). Revisiting Beta-lactams - PK/PD improves dosing of old antibiotics. Curr Opin Pharmacol. 11 (5): 470 - 476.

MacGowan, A. P.; Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. J Antimicrob Chemother. 48 (Suppl 1): 17 - 28.

Maes, A.; Meyns, T.; Sustronck, B.; Maes, D.; de Backer, P.; Croubels, S. (2007). Determination of cefquinome in pig plasma and bronchoalveolar lavage fluid by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom. 42 (5): 657 - 663.

Mao, Q. (2008). BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. Pharm Res. 25 (6): 1244 - 1255.

Marco, J. C. L.; Esnal, A.; Marco, P.; Ramo, M.; Fantova, E. (2008). Prevalencia de mamitis subclínicas en rebaños de ovino de carne de Aragón. Profesión Veterinaria. 16 (69): 70 - 73.

Marin, J. J. G.; Briz, O.; Serrano, M. A. (2004). A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. Current Drug Delivery. 1 (3): 275 - 289.

Marín, P.; Escudero, E.; Fernández-Varón, E.; Cárceles, C. M. (2007). Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. J Dairy Sci. 90 (9): 4219 - 4225.

Marroum, P. J.; Webb, A. I.; Aeschbacher, G.; Curry, S. H. (1994). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acepromazine in horses. Am J Vet Res. 55 (10): 1428 - 1433.

Martin, S; Meek, A; Willeberg, P (1997). Epidemiología veterinaria. Principios y métodos. Acribia. Zaragoza. Pp 384.

Martinez, M.; Modric, S. (2010). Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. J Vet Pharmacol Ther. 33: 213 - 216.

Matta, A.; Etchegorry, C.; Magnano, C.; Orchansky, C.; Suárez, G.; Paiva, E. (2007). Estrategias comerciales para el sector caprino. Estudio de caso de la cadena caprina. Agencia para el Desarrollo Económico de la Ciudad de Córdoba. Programa de Desarrollo de Cadenas Productivas en la Provincia de Córdoba. Pp. 81.

McDowall, R. D. (2005). Validation of chromatography data systems: meeting business and regulatory requirements. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. Pp 259.

McElroy, D.; Ravis, W. R.; Clark, C. H. (1986). Pharmacokinetics of cefotaxime in the domestic cat. Am J Vet Res. 47 (1): 86 - 88.

McKellar, Q. A.; Sanchez Bruni, S. F.; Jones, D. G. (2004). Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 503 - 514.

McKellar, Q.; Gibson, I.; Monteiro, A.; Bregante, M. (1999). Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. Antimicrobial Antimicrob Agents Chemother. 43: 1988-1992.

Mealey KL. (2012). ABCG2 transporter: therapeutic and physiologic implications in veterinary species. J Vet Pharmacol Ther. 35 (2): 105 - 112.

Mella, S. M.; Zemelman, C. M.; Bello, H. T.; Dominguez, M. Y.; Gonzalez, G. R.; Zemelman, R. Z. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. Rev Chil Infectol. 18 (1): 7 - 19.

Melnikow, E.; Schoenfeld, C.; Spehr, V.; Warrass, R.; Gunkel, N.; Duszenko, M.; Selzer, P. M.; Ullrich, H. J. (2008). A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. Vet Microbiol. 131 (3-4): 277 - 292.

Mendez, A. S.; Weisheimer, V.; Oppe, T. P.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. (2005). Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. J Pharm Biomed Anal. 37 (4): 649 - 653.

Meyer, S.; Giguère, S.; Rodriguez, R.; Zielinski, R. J.; Grover, G. S.; Brown, S. A. (2009). Pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium and concentration in body fluids of foals. J Vet Pharmacol Ther. 32 (4): 309 - 316.

Morita, E.; Mizuno, N.; Nishikata, M.; Miyake, K. (1990). Comparison of the pharmacokinetics of five beta-lactam antibiotics between neonatal and adult rats. Dev Pharmacol Ther. 14 (4): 223 - 230.

Moroni, P.; Pisoni, G.; Antonini, M.; Ruffo, G.; Carli, S.; Varisco, G.; Boettcher, P. (2005). Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. J Dairy Sci. 88 (5): 1694 - 1704.

Nau, R.; Sörgel, F.; Eiffert, H. (2010). Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. Clin Microbiol Rev.23 (4): 858 - 883.

Nouws, J. F. (1992). Pharmacokinetics in immature animals: a review. J Anim Sci. 70 (11): 3627 - 3634.

Odenholt, I. (2001). Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Int J Antimicrob Agents. 17 (1): 1 - 8.

Oliver, S. P.; Gonzalez, R. N.; Hogan, J. S.; Jayarao, B. M.; Owens, W. E. (2004). Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4$^{th}$ ed. Verona, WI.: National Mastitis Council.

Oukessou, M.; Benlamlih, S.; Toutain, P. L. (1990). Benzylpenicillin kinetics in the ewe: influence of pregnancy and lactation. Res Vet Sci. 49 (2): 190 - 193.

Oukessou, M.; Toutain, P. L. (1992). Influence of the stage of pregnancy on gentamicin disposition in the ewe. Ann Rech Vet. 23 (2): 145 - 150.

Paap, C. M.; Nahata, M. C. (1990). Clinical pharmacokinetics of antibacterial drugs in neonates. Clin Pharmacokinet. 19 (4): 280 - 318.

Paape, M. J.; Contreras, A. (2000). Limitaciones legales y problemática de los recuentos celulares en leche de vaca y cabra en los Estados Unidos. Ovis. 67: 13 - 23.

Pacifici, G. M. (2011). Pharmacokinetics of cephalosporins in the neonate: a review. Clinics (Sao Paulo). 66 (7): 1267 - 1274.

Palanivel, K. M.; Selvasubramanian, S.; Nedunchelliyan, S. (2005). Treatment of clinical mastitis with cefquinome. Indian Vet J. 82 (12): 1313 - 1314.

Papich, M.; Riviere, J. (2009). Beta-lactam antibiotics: penicillins, cephalosporins, and related dugs. *In*: Riviere, J. and Papich, M. Veterinary Pharamacology and Therapeutics. 9$^{th}$ ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp: 865 - 893.

Papich, M. G.; Davis, J. L.; Floerchinger, A. M. (2010). Pharmacokinetics, protein binding, and tissue distribution of orally administered cefpodoxime proxetil and cephalexin in dogs. Am J Vet Res. 71 (12): 1484 - 1491.

Papini, O.; da Cunha, S. P.; da Silva Mathes Ado, C.; Bertucci, C.; Moisés, E. C.; de Barros Duarte, L.; de Carvalho Cavalli, R.; Lanchote, V. L. (2006). Kinetic disposition of lorazepam with focus on the glucuronidation capacity, transplacental transfer in parturients and racemization in biological samples. J Pharm Biomed Anal. 40 (2): 397 - 403.

Parlevliet , J.; Lynn, J.; Paccamonti, D. (2006). The use of cefquinome in equine semen extender. Anim Reprod Sci. 94: 121 - 124.

Pavek, P.; Ceckova, M.; Staud, F. (2009). Variation of drug kinetics in pregnancy. Curr Drug Metab. 10 (5): 520 - 529.

Pérez, R.; Palma, C.; Núñez, M. J.; Cox, J. (2008a). Pharmacokinetics of ivermectin after maternal or fetal intravenous administration in sheep. J Vet Pharmacol Ther.31 (5): 406 - 414.

Pérez, R.; Palma, C.; Núñez, M. J.; Cox, J.; Arboix, M. (2008b). Pharmacokinetics of ivermectin in pregnant and nonpregnant sheep. J Vet Pharmacol Ther. 31 (1): 71 - 76.

Pérez R, Palma C, Núñez MJ, Navas M, Olmos G, Cox J. (2009). Transplacental exchange of moxidectin after maternal or fetal intravenous administration in sheep. J Vet Pharmacol Ther. 32 (6): 596 - 605.

Pérez, R.; Palma, C.; Núñez, M.J.; Urrutia, P.; Salazar, A.; Morales, L.; Vera, D.; Cox, J. (2010). Influence of verapamil on pharmacokinetics and transplacental transfer of ivermectin in sheep. Small Rumin Res. 93: 103 - 109.

Petracca, K.; Riond, J. L.; Graser, T.; Wanner, M. (1993). Pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin: influence of pregnancy and lactation in sows. Zentralbl Veterinarmed A. 40 (1): 73 - 79.

Picco, E.; Stiefel, S.; Cerra, M.; Michel, A.; Rubio, M.; Formentini, E. (2009). Antibacterianos: certezas e hipótesis acerca de la relación farmacocinética-farmacodinámica (PK-PD) de los mismos. Panorama Actual Med. 33 (327): 994 - 1007.

Popick, A. C.; Crouthamel, W. G.; Bekersky, I. (1987). Plasma protein binding of ceftriaxone. Xenobiotica. 17 (10): 1139 - 1145.

Popović, J; Grujić, Z.; Sabo, A. (2007). Influence of pregnancy on ceftriaxone, cefazolin and gentamicin pharmacokinetics in caesarean *vs* non-pregnant sectioned women. J Clin Pharm Ther. 32 (6): 595 - 602.

Prawez, S.; Raina, R.; Dimitrova, D.; Pankaj, N. K.; Ahanger, A. A.; Verma, P.K. (2010). The pharmacokinetics of cefepime in goats following single-dose i.v. and i.m. administration. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 34 (5): 427 - 431.

Prescott, J. (2006). Beta-lactam antibiotics: cephalosporins. *In*: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 139 - 158.

Rajput, N.; Dumka, V. K.; Sandhu, H. S. (2007). Disposition kinetics and urinary excretion of cefpirome after intravenous injection in buffalo calves. J Vet Sci. 8 (1): 21 - 25.

Ramsey, P. S.; Vaules, M. B.; Vasdev, G. M.; Andrews, W. W.; Ramin, K. D. (2003). Maternal and transplacental pharmacokinetics of azithromycin. Am J Obstet Gynecol. 188 (3): 714 - 718.

Riviere, J. (2009). Pharmacokinetic. *In*: Riviere, J. and Papich, M. Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th ed. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 1524

Riviere, J. (2011). Noncompartmental models. *In*: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 456.

Rohdich, N.; Zschiesche, E.; Heckeroth, A.; Wilhelm, C.; Leendertse, I.; Thomas, E. (2009). Treatment of septicaemia and severe bacterial infections in foals with a new cefquinome formulation: a field study. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 116 (9): 316 - 320.

Roncada, P.; Tomasi, L.; Stracciari, G. L.; Ermini, L.; Strocchia, A. (2000). Milk depletion of dicloxacillin residues in cows and sheep following intramammary administration. J Vet Pharmacol Ther. 23 (4): 237 - 241.

Rosin, E.; Uphoff, T. S.; Schultz-Darken, N. J.; Collins, M. T. (1993). Cefazolin antibacterial activity and concentrations in serum and the surgical wound in dogs. Am J Vet Res. 54 (8): 1317 - 1321.

Rossanigo, C. E.; Sager R. L. (2002). Casuística diagnóstica del ganado caprino en el centro-oeste de la Argentina. XIV Reunión Científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico. Villa Gral Belgrano, Prov. de Córdoba, 13 al 15 de noviembre de 2002.

Roy, B. K.; Singh, K. K.; Shrivastava, A. K. (1997). Effect of chronic fenvalerate intoxication on the biokinetics of cephaloridine in goats. J Interacademicia. 1 (1): 69 - 73.

Rule, R.; Quiroga, G. H.; Rubio, M.; Buschiazzo, H. O.; Buschiazzo, P. M. (1996). The pharmacokinetics of ceftazidime in lactating and non-lactating cows. Vet Res Commun. 20 (6): 543 - 550.

Rule, R.; Villagra, S.; Barrena, P.; Lacchini, R.; Reynaldi, F. J. (2011). Pharmacokinetics of ceftazidime administered to lactating and non-lactating goats. J S Afr Vet Assoc. 82 (4): 219 - 223.

Russi, N.; Calvinho, L.; Diaz, P.; Picco, E. (2008). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cefquinoma frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de secreciones lácteas de bovinos de la cuenca lechera central argentina afectados por mastitis. Compendio de trabajos e investigaciones de la EEA – INTA, Rafaela. Pág. 37.

Ryan, D. P.; Greenwood, P. L. (1990). Prevalence of udder bacteria in milk samples from four dairy goat herds. Aust. Vet. J. 67 (10): 362 - 363.

San Andrés, M. D.; Boggio, J. C. (2007). Introducción a los antimicrobianos. *En*: San Andres M.; Boggio, J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Intermédica. Buenos Aires. Pp. 1 - 24.

San Andrés M. D.; de Lucas J. (2007). Paso de los antimicrobianos a través de las barreras biológicas. *En*: San Andres M.; Boggio, J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Intermédica. Buenos Aires. Pp. 33 - 54.

San Martin, B.; Kruze, J.; Morales, M. A.; Agüero, H.; Leon, B.; Esppinoza, S.; Iragüen, D.; Puga, J.; Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Arch. med. Vet. 34 (2): 221 - 234.

Sánchez, A.; Contreras, A.; Corrales, J. C. (1997). Aspectos epidemiológicos de las mamitis caprinas en relación con los programas de control. Ovis. 53: 67 - 92.

Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J. C. (1999). Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. Small Rumin Res. 31 (3): 197 - 201.

Santos, A. C.; Arthur, G. R.; Lehning, E. J.; Finster, M. (1997). Comparative pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes. Anesth Analg. 85 (1): 87 - 93.

Santos, A. C.; Pedersen, H.; Morishima, H. O.; Finster, M.; Arthur, G. R.; Covino, B. G. (1988). Pharmacokinetics of lidocaine in nonpregnant and pregnant ewes. Anesth Analg. 67 (12): 1154 - 1158.

Santschi, E. M.; Papich, M. G. (2000). Pharmacokinetics of gentamicin in mares in late pregnancy and early lactation. J Vet Pharmacol Ther. 23 (6): 359 - 363.

Schaeren, W.; Maurer, J. (2006). Prevalence of subclinical udder infections and individual somatic cell counts in three dairy goat herds during a full lactation. Schweiz Arch Tierheilkd. 148 (12): 641 - 648.

Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev. 55 (1): 23 - 29.

Schmidt, C. A.; Agarrayua, D. A.; Laporta, L. V.; Machado, J. C.; Manfio, M. L.; Bittencourt, C. F. (2009). Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. J Microbiol Methods. 77 (3): 308 - 315.

Schoondermark-Van de Ven, E.; Galama, J.; Camps, W.; Vree, T.; Russel, F.; Meuwissen, J.; Melchers, W. (1994). Pharmacokinetics of spiramycin in the rhesus monkey: transplacental passage and distribution in tissue in the fetus. Antimicrob Agents Chemother. 38 (9): 1922 - 1929.

Schurman, D. J.; Burton, D. S.; Kajiyama, G.; Moser, K.; Nagel, D. A. (1976). Sodium cephapirin disposition and distribution into human bone. Curr Ther Res Clin Exp. 20 (2): 194 - 203.

Schwark W. S. (1992). Factors that affect drug disposition in food-producing animals during maturation. J Anim Sci. 70 (11): 3635 - 3645.

Sellyei, B.; Varga, Z.; Szentesi-Samu, K.; Kaszanyitzky, E.; Magyar, T. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. Acta Vet Hung. 57 (3): 357 - 367.

Sheldon, I. M.; Bushnell, M.; Montgomery, J.; Rycroft, A. N. (2004). Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. Vet Rec. 155 (13): 383 - 387.

Shoaf, S. E; Schwark, W. S.; Guard, C. L. (1989). Pharmacokinetics of sulfadiazine/trimethoprim in neonatal male calves: effect of age and penetration into cerebrospinal fluid. Am J Vet Res. 50 (3): 396 - 403.

Short, C. R.; Tumbleson, M. E. (1973). Binding of drugs to plasma proteins of swine during the perinatal period. Toxicol Appl Pharmacol. 24 (4): 612 - 624.

Shpigel, N. Y.; Kass, P. H.; Saran, A. (2006). A comparative randomized field trial on intramammary and intramuscular dry cow antibiotic treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 53 (8): 418 - 422.

Shpigel, N. Y.; Levin, D.; Winkler, M.; Saran, A.; Ziv, G.; Bottner, A. (1997). Efficacy of cefquinome for treatment of cows with mastitis experimentally induced using *Escherichia coli*. J Dairy Sci. 80 (2): 318 - 323.

Singh, R.; Saxena, A.; Singh, H. (2009). Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. J Biomed Sci. 16 (1): 109.

Smiet, E.; Haritova, A.; Heil, B. A.; Fink-Gremmels, J.; Wijnberg, I. D. (2012). Comparing the pharmacokinetics of a fourth generation cephalosporin in three different age groups of New Forest ponies. Equine Vet J. 44 Suppl. (41): 52 - 56.

Smith, G. W; Gehring, R.; Riviere, J. E.; Yeatts, J. L.; Baynes, R. E. (2004). Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 224 (11): 1827 - 1830.

Smith, M.; Sherman, D. (2009). Goat medicine. 2nd ed. Wiley - Blackwell. Iowa USA. Pp. 871.

Soback, S.; Bor, A.; Ziv, G. (1987). Clinical pharmacology of cefazolin in calves. Zentralbl Veterinarmed A. 34 (1): 25 - 32.

Soback, S.; Gips, M.; Bialer, M.; Bor, A. (1994). Effect of lactation on single-dose pharmacokinetics of norfloxacin nicotinate in ewes. Antimicrob Agents Chemother. 38 (10): 2336 - 2339.

Soback, S.; Ziv, G. (1988). Pharmacokinetics and bioavailability of ceftriaxone administered intravenously and intramuscularly to calves. Am J Vet Res. 49 (4): 535 - 538.

Soback, S.; Ziv, G.; Bor, A.; Shapira, M. (1988). Pharmacokinetics of cephalexin glycinate in lactating cows and ewes. Zentralbl Veterinarmed A. 35 (10): 755 - 760.

Sørensen, L.; Snor, L. (2000). Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 882 (1-2): 145 - 151.

Souza, M. J.; Kulmann, R. R.; Silva, L. M.; Nogueira, D. R.; Zimmermann, E. S.; Schmidt, C. A. (2006). Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. J AOAC Int. 89 (5): 1367 - 1372.

Stacey, T. E.; Boyd, R. D.; Ward, R. H.; Weedon, A. P. (1977). Placental permeability in the sheep. Ann Rech Vet. 8 (4): 345 - 352.

Stannarius, C.; Bürgi, E.; Regula, G.; Zychowska, M. A.; Zweifel, C.; Stephan, R. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. Schweiz Arch Tierheilkd. 151 (3): 119 - 125.

Stegemann, M. R.; Sherington, J.; Blanchflower, S. (2006a). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. J Vet Pharmacol Ther. 29 (6): 501 - 511.

Stegemann, M. R.; Sherington, J.; Coati, N.; Brown, S. A.; Blanchflower, S. (2006b). Pharmacokinetics of cefovecin in cats. J Vet Pharmacol Ther. 29 (6): 513 - 524.

Stockler, R. M.; Morin, D. E.; Lantz, R. K.; Hurley, W. L.; Constable, P. D. (2009). Effect of milk fraction on concentrations of cephapirin and desacetylcephapirin in bovine milk after intramammary infusion of cephapirin sodium. J Vet Pharmacol Ther. 32 (4): 345 - 352.

Suhren, G.; Knappstein, K. (2003). Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods. Analytica Chimica Acta, 483 (1-2): 363 - 372.

Swai, E.S.; Mbise, E.; Mtui, P. F. (2008). Occurrence and factors associated with udder infections in small holder lactating dairy goats in Arumeru district, Tanzania. 20 (210). http://www.lrrd.org/lrrd20/12/swai20210.htm

Thomas, E.; Thomas, V.; Wilhelm, C. (2006). Antibacterial activity of cefquinome against equine bacterial pathogens. Vet Microbiol. 115 (1-3): 140 - 147.

Thomas, E.; Roy, O.; Skowronski, V.; Zschiesche, E.; Martin, G.; Böttner, A. (2004). Comparative field efficacy study between cefquinome and gentamicin in neonatal calves with clinical signs of septicaemia. Revue de Médecine Vétérinaire 155 (10): 489 - 493.

Thrusfield, M. (2005). Veterinary epidemiology. 3ª ed. Blackwell Science. Oxford. Pp 610.

Tibary, A.; Van Metre, D. ()2005. Cirugía de los sistemas reproductor y urinario en ovinos y caprinos. *En*: Fubini, S.; Ducharme, N. Cirugía en animales de granja. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina; 2005. Pp: 547 – 567.

Tohamy, M. A. (2011). Age-related intramuscular pharmacokinetics of cefquinome in sheep. Small Rumin Res. 99 (1): 72 - 76.

Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004a). Bioavailability and its assessment. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 455 - 466.

Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma clearance. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 415 - 425.

Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004c). Plasma terminal half-life. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 427 - 439.

Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004d). Volumes of distribution. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 441 - 453.

Toutain, P. L.; del Castillo J. R.; Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res Vet Sci. 73 (2): 105 - 114.

Toutain, P. L.; Lees, P. (2004). Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. 27 (6): 467 - 477.

Tozer, T.; Rowland, M. (2006). Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy. Lippincott Williams and Wilkins. London. Pp. 326.

Tsuji, A.; Terasaki, T.; Imaeda, N.; Nishide, K.; Nakashima, E. (1985). Effect of extracellular water volume on the distribution kinetics of beta-lactam antibiotics as a function of age. J Pharmacobiodyn. 8 (3): 167 - 174.

Valenti, A.; Flores, C.; Valenti, E.; Castillo, N. (2002). Explotación integral del ganado caprino en Santiago del Estero: Mercado de lacteo y carne caprina. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. Pp 314.

Vallano, A.; Arnau, J. M. (2009). Antimicrobianos y embarazo. Enferm Infecc Microbiol Clin. 27 (9): 536 - 542.

Van Bambeke, F.; Tyteca, D.; Ouadrhiri, Y. et Tulkens, P.M. (1999). Optimisation des traitments antibacteriens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. Louvain Medicine. 118: 43 - 63.

VICH (1998a). Guidelines on Good Clinical Practice (GCP). Topic GL 9 . CVMP/VICH/595/98-FINAL.

VICH (1998b). Validation of analytical procedures: Methodology. GL 2/ 1998.

VICH (2008). Target animal safety for veterinary pharmaceutical products. GL 43/2008.

Villa, R.; Sonzogni, O.; Cagnardi, P.; Bacchetta, S.; Pravettoni, D.; Carli, S (2001). Cefalexin dose in calves: kinetics and bioavailability of different pharmaceutical preparations. Large Anim Rev. 7 (6): 17 - 21.

Vivanco, M. (2005). Muestreo estadístico: diseño y aplicaciones. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. Pp. 209.

Wackowiez, G.; Richard, J. J.; Fabreguettes, G (1997). Pharmacokinetics of cefalexin in plasma and urine after single intravenous and oral (tablets) administration in dogs. J Vet Pharmacol Ther. 20 (Suppl 1): 63 - 64.

Wallmann, J.; Schröter, K.; Wieler, L. H.; Kroker, R. (2003). National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. Int J Antimicrob Agents. 22 (4): 420 - 428.

Waterman, N. G.; Scharfenberger, L. F. (1978). Concentration relationships of cefaclor in serum, interstitial fluid, bile and urine of dogs. Antimicrob Agents Chemother. 14 (4): 614 - 616.

Watson, A. D.; van Gogh, H.; van Deurzen, E. J.; van Duin, C. T.; van Miert, A. S. (1987). Pharmacokinetics of three sulphonamides in ruminant and preruminant kids. Res Vet Sci. 43 (2): 208 - 216.

Waxman, S.; San Andrés, M. D.; González, F.; San Andrés, M. I.; De Lucas, J. J.; Rodríguez, C. (2004). Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. J Vet Pharmacol Ther. 27 (1): 31 - 35.

Whittem, T. (1999). Pharmacokinetics and milk discard times of pirlimycin after intramammary infusion: a population approach. J Vet Pharmacol Ther. 22 (1): 41 - 51.

Wilson, W. D.; Baggot, J. D.; Adamson, P. J. W.; Hirsh, D. C.; Hietala, S. K. (1985). Cefadroxil in the horse: pharmacokinetics and *in vitro* antibacterial activity. J Vet Pharmacol Ther. 8 (3): 246 - 253

Winther, L.; Baptiste, K. E.; Friis, C. (2011). Antimicrobial disposition in pulmonary epithelial lining fluid of horses, part III: cefquinome. J Vet Pharmacol Ther. 34 (5): 482 - 486.

Wisselink, H. J.; Veldman, K. T; Van den Eede, C.; Salmon, S. A.; Mevius, D. J. (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. Vet Microbiol. 113 (1-2): 73 - 82.

Witt, A.; Sommer, E. M., Cichna, M.; Postlbauer, K; Widhalm, A.; Gregor, H.; Reisenberger, K. (2003). Placental passage of clarithromycin surpasses other macrolide antibiotics. Am J Obstet Gynecol. 188 (3): 816 - 819.

Wright, D. H.; Brown, G. H.; Peterson, M. L.; Rotschafer, J. C. (2000). Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. J Antimicrob Chemother. 46 (5): 669 - 683.

Zhang, X.; Li, J.; Jiang, H.; Shen, J. (2007). Residue depletion of cefquinome in swine tissues after intramuscular administration. J Agric Food Chem. 55 (25): 10493 - 10498.

Ziv, G.; Kurtz, B.; Risenberg, R.; Glickman, A. (1995). Serum and milk concentrations of apramycin in lactating cows, ewes and goats. J Vet Pharmacol Ther. 18 (5): 346 - 351.

Zonca, A.; Gallo, M.; Locatelli, C.; Carli, S.; Moroni, P.; Villa, R.; Cagnardi, P. (2011). Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. J Dairy Sci. 94 (7): 3455 - 3461.

# IX.- ANEXO

# IX.- ANEXO

## IX.1.- Tablas de validación del método cromatográfico

### IX.1.1.- Validación de cefquinoma en suero

Tabla 56: Datos de las áreas bajo la curva (ABC) cromatográficas para el análisis de variación intra-día de cefquinoma en suero.

| Conc. (µg/ml) | ABC DIA 1 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | **CV (%)** |
| 0,037 | 867 | 822 | 839 | 817 | 821 | 750 | **4,72** |
| 0,074 | 1.145 | 1.203 | 1.180 | 1.156 | 1.080 | 1.092 | **4,24** |
| 0,121 | 1.506 | 1.506 | 1.361 | 1.361 | 1.495 | 1.466 | **4,82** |
| 0,607 | 6.053 | 5.744 | 5.635 | 5.994 | B5.837 | 5.920 | **2,68** |
| 1,249 | 10.706 | 10.895 | 10.917 | 10.777 | 10.721 | 10.756 | **0,83** |
| 3,034 | 24.542 | 24.744 | 24.602 | 24.781 | 24.167 | 24.599 | **0,89** |
| 6,068 | 52.797 | 52.565 | 56.540 | 54.509 | 53.689 | 56.239 | **3,12** |
| 10,113 | 75.914 | 73.993 | 73.524 | 72.596 | 72.111 | 74.096 | **1,81** |
| 20,226 | 171.356 | 171.277 | 170.846 | 171.963 | 171.308 | 171.277 | **0,21** |
| 30,339 | 244.844 | 246.133 | 245.938 | 246.839 | 246.628 | 246.518 | **0,29** |
| Conc. (µg/ml) | **ABC DIA 2** | | | | | | |
| | TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | **CV (%)** |
| 0,037 | 730 | 825 | 717 | 771 | 834 | 830 | **6,71** |
| 0,074 | 1.059 | 1.186 | 1.004 | 952 | 1.030 | 1.092 | **7,64** |
| 0,121 | 1.489 | 1.351 | 1.251 | 1.251 | 1.433 | 1.428 | **7,32** |
| 0,607 | 6.094 | 5.698 | 5.953 | 5.805 | 5.920 | 6.109 | **2,71** |
| 1,249 | 10.751 | 10.789 | 10.558 | 10.635 | 11.042 | 10.632 | **1,61** |
| 3,034 | 23.506 | 23.286 | 23.042 | 23.354 | 23.188 | 23.122 | **0,72** |
| 6,068 | 55.057 | 54.304 | 54.004 | 54.509 | 53.689 | 55.298 | **1,13** |
| 10,113 | 74.449 | 73.152 | 74.202 | 74.096 | 72.155 | 73.165 | **1,18** |
| 20,226 | 171.179 | 170.366 | 170.516 | 170.954 | 169.961 | 170.376 | **0,26** |
| 30,339 | 267.325 | 268.571 | 268.482 | 269.529 | 269.920 | 269.910 | **0,38** |
| Conc. (µg/ml) | **ABC DIA 3** | | | | | | |
| | TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | **CV (%)** |
| 0,037 | 864 | 727 | 688 | 820 | 824 | 780 | **8,42** |
| 0,074 | 1.060 | 948 | 946 | 1.086 | 1.123 | 1.105 | **7,51** |
| 0,121 | 1.465 | 1.351 | 1.370 | 1.389 | 1.263 | 1.263 | **5,76** |
| 0,607 | 5.391 | 5.532 | 5.612 | 5.787 | 5.728 | 5.869 | **3,12** |
| 1,249 | 10.247 | 10.362 | 10.478 | 10.699 | 10.447 | 10.783 | **1,93** |
| 3,034 | 23.525 | 23.170 | 23.193 | 22.999 | 23.204 | 23.537 | **0,92** |
| 6,068 | 49.620 | 49.333 | 49.353 | 52.509 | 51.689 | 48.161 | **3,27** |
| 10,113 | 69.168 | 67.748 | 68.595 | 71.826 | 68.467 | 68.816 | **2,05** |
| 20,226 | 166.691 | 165.601 | 166.685 | 181.131 | 167.400 | 165.701 | **3,58** |
| 30,339 | 268.366 | 261.676 | 261.786 | 260.937 | 261.908 | 261.918 | **1,05** |

Tabla 57: Datos de las áreas bajo la curva (ABC) cromatográficas para el análisis de la variación inter-día de cefquinoma en suero.

| Conc. (µg/ml) | 0,037 | 0,074 | 0,121 | 0,607 | 1,249 | 3,034 | 6,068 | 10,113 | 20,226 | 30,339 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ABC DIA 1 | 867 | 1.145 | 1.506 | 6.053 | 10.706 | 24.542 | 52.797 | 75.914 | 171.356 | 244.844 |
| | 822 | 1.203 | 1.506 | 5.744 | 10.895 | 24.744 | 52.565 | 73.993 | 171.277 | 246.133 |
| | 839 | 1.180 | 1.361 | 5.635 | 10.917 | 24.602 | 56.540 | 73.524 | 170.846 | 245.938 |
| | 817 | 1.156 | 1.361 | 5.994 | 10.777 | 24.781 | 54.509 | 72.596 | 171.963 | 246.839 |
| | 821 | 1.080 | 1.495 | 5.837 | 10.721 | 24.167 | 53.689 | 72.111 | 171.308 | 246.628 |
| | 750 | 1.092 | 1.466 | 5.920 | 10.756 | 24.599 | 56.239 | 74.096 | 171.277 | 246.518 |
| ABC DIA 2 | 730 | 1.059 | 1.489 | 6.094 | 10.751 | 23.506 | 55.057 | 74.449 | 171.179 | 267.325 |
| | 825 | 1.186 | 1.351 | 5.698 | 10.789 | 23.286 | 54.304 | 73.152 | 170.366 | 268.571 |
| | 717 | 1.004 | 1.251 | 5.953 | 10.558 | 23.042 | 54.004 | 74.202 | 170.516 | 268.482 |
| | 771 | 952 | 1.251 | 5.805 | 10.635 | 23.354 | 54.509 | 74.096 | 170.954 | 269.529 |
| | 834 | 1.030 | 1.433 | 5.920 | 11.042 | 23.188 | 53.689 | 72.155 | 169.961 | 269.920 |
| | 830 | 1.092 | 1.428 | 6.109 | 10.632 | 23.122 | 55.298 | 73.165 | 170.376 | 269.910 |
| ABC DIA 3 | 864 | 1.060 | 1.465 | 5.391 | 10.247 | 23.525 | 49.620 | 69.168 | 166.691 | 268.366 |
| | 727 | 948 | 1.351 | 5.532 | 10.362 | 23.170 | 49.333 | 67.748 | 165.601 | 261.676 |
| | 688 | 946 | 1.370 | 5.612 | 10.478 | 23.193 | 49.353 | 68.595 | 166.685 | 261.786 |
| | 820 | 1.086 | 1.389 | 5.787 | 10.699 | 22.999 | 52.509 | 71.826 | 181.131 | 260.937 |
| | 824 | 1.123 | 1.263 | 5.728 | 10.447 | 23.204 | 51.689 | 68.467 | 167.400 | 261.908 |
| | 780 | 1.105 | 1.263 | 5.869 | 10.783 | 23.537 | 48.161 | 68.816 | 165.701 | 261.918 |
| **C.V. (%)** | **6,68** | **7,45** | **6,5** | **3,38** | **1,88** | **2,80** | **4,68** | **3,44** | **2,03** | **3,87** |

Tabla 58: Exactitud de la técnica analítica (HPLC) para concentraciones de cefquinoma en suero, entre 0,037 a 1,249 µg/ml

| Inyecc. HPLC | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,037 | 0,044 | **118,04** | 0,074 | 0,077 | **104,56** | 0,121 | 0,121 | **100,11** | 0,607 | 0,679 | **111,88** | 1,249 | 1,277 | **102,25** |
| 2 | 0,037 | 0,043 | **117,05** | 0,074 | 0,084 | **114,06** | 0,121 | 0,121 | **100,11** | 0,607 | 0,677 | **111,58** | 1,249 | 1,262 | **101,04** |
| 3 | 0,037 | 0,04 | **108,86** | 0,074 | 0,082 | **110,29** | 0,121 | 0,104 | **85,59** | 0,607 | 0,672 | **110,76** | 1,249 | 1,259 | **100,82** |
| 4 | 0,037 | 0,038 | **101,66** | 0,074 | 0,071 | **95,88** | 0,121 | 0,104 | **85,59** | 0,607 | 0,665 | **109,59** | 1,249 | 1,246 | **99,80** |
| 5 | 0,037 | 0,032 | **86,59** | 0,074 | 0,069 | **93,91** | 0,121 | 0,102 | **84,58** | 0,607 | 0,66 | **108,77** | 1,249 | 1,246 | **99,74** |
| 6 | 0,037 | 0,03 | **80,84** | 0,074 | 0,067 | **90,64** | 0,121 | 0,112 | **84,58** | 0,607 | 0,656 | **108,11** | 1,249 | 1,245 | **99,68** |
| 7 | 0,037 | 0,03 | **81,07** | 0,074 | 0,067 | **90,47** | 0,121 | 0,124 | **102,21** | 0,607 | 0,656 | **108,11** | 1,249 | 1,242 | **99,47** |
| 8 | 0,037 | 0,033 | **88,30** | 0,074 | 0,063 | **85,72** | 0,121 | 0,129 | **106,75** | 0,607 | 0,65 | **107,09** | 1,249 | 1,242 | **99,43** |
| 9 | 0,037 | 0,03 | **81,50** | 0,074 | 0,06 | **81,46** | 0,121 | 0,099 | **82,00** | 0,607 | 0,646 | **106,45** | 1,249 | 1,238 | **99,14** |
| 10 | 0,037 | 0,04 | **107,44** | 0,074 | 0,064 | **86,46** | 0,121 | 0,099 | **82,00** | 0,607 | 0,642 | **105,81** | 1,249 | 1,236 | **98,99** |
| 11 | 0,037 | 0,04 | **107,23** | 0,074 | 0,063 | **85,80** | 0,121 | 0,112 | **92,80** | 0,607 | 0,64 | **105,45** | 1,249 | 1,236 | **98,92** |
| 12 | 0,037 | 0,039 | **105,92** | 0,074 | 0,059 | **80,17** | 0,121 | 0,112 | **92,30** | 0,607 | 0,635 | **104,59** | 1,249 | 1,228 | **98,30** |
| 13 | 0,037 | 0,038 | **103,29** | 0,074 | 0,079 | **106,36** | 0,121 | 0,116 | **96,00** | 0,607 | 0,633 | **104,27** | 1,249 | 1,227 | **98,27** |
| 14 | 0,037 | 0,038 | **102,97** | 0,074 | 0,082 | **111,28** | 0,121 | 0,119 | **98,41** | 0,607 | 0,629 | **103,67** | 1,249 | 1,218 | **97,55** |
| 15 | 0,037 | 0,039 | **104,28** | 0,074 | 0,071 | **95,88** | 0,121 | 0,105 | **86,49** | 0,607 | 0,622 | **102,42** | 1,249 | 1,209 | **96,78** |
| 16 | 0,037 | 0,038 | **102,64** | 0,074 | 0,07 | **94,89** | 0,121 | 0,107 | **88,39** | 0,607 | 0,619 | **101,96** | 1,249 | 1,205 | **96,48** |
| 17 | 0,037 | 0,033 | **89,53** | 0,074 | 0,075 | **100,96** | 0,121 | 0,12 | **99,01** | 0,607 | 0,609 | **100,36** | 1,249 | 1,195 | **95,65** |
| 18 | 0,037 | 0,038 | **103,95** | 0,074 | 0,073 | **98,01** | 0,121 | 0,116 | **96,10** | 0,607 | 0,592 | **97,54** | 1,249 | 1,181 | **94,53** |

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de "x" de la ecuación de la recta de calibrado **y = 8249,3x + 506,72** donde el valor de "y" corresponde a las ABC de las tablas 56 y 57 este Anexo.

Tabla 59: Exactitud de la técnica analítica HPLC para concentraciones de cefquinoma en suero, entre 3,034 a 30,339 µg/ml

| Inyecc. HPLC | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,034 | 3,276 | **107,97** | 6,068 | 6,981 | **115,05** | 10,113 | 9,241 | **91,38** | 20,226 | 21,517 | **106,38** | 30,339 | 31,876 | **105,06** |
| 2 | 3,034 | 3,272 | **107,83** | 6,068 | 6,946 | **114,47** | 10,113 | 9,071 | **89,69** | 20,226 | 20,447 | **101,09** | 30,339 | 31,874 | **105,06** |
| 3 | 3,034 | 3,255 | **107,28** | 6,068 | 6,836 | **112,66** | 10,113 | 9,042 | **89,41** | 20,226 | 20,376 | **100,74** | 30,339 | 31,83 | **104,91** |
| 4 | 3,034 | 3,255 | **107,27** | 6,068 | 6,808 | **112,20** | 10,113 | 9,029 | **89,28** | 20,226 | 20,371 | **100,72** | 30,339 | 31,718 | **104,55** |
| 5 | 3,034 | 3,248 | **107,05** | 6,068 | 6,744 | **111,14** | 10,113 | 9,029 | **89,28** | 20,226 | 20,367 | **100,70** | 30,339 | 31,708 | **104,51** |
| 6 | 3,034 | 3,204 | **105,61** | 6,068 | 6,744 | **111,14** | 10,113 | 9,017 | **89,17** | 20,226 | 20,367 | **100,70** | 30,339 | 31,694 | **104,47** |
| 7 | 3,034 | 3,131 | **103,19** | 6,068 | 6,72 | **110,75** | 10,113 | 8,963 | **88,62** | 20,226 | 20,356 | **100,64** | 30,339 | 31,573 | **104,07** |
| 8 | 3,034 | 3,129 | **103,14** | 6,068 | 6,685 | **110,17** | 10,113 | 8,921 | **88,21** | 20,226 | 20,329 | **100,51** | 30,339 | 30,942 | **101,99** |
| 9 | 3,034 | 3,127 | **103,07** | 6,068 | 6,649 | **109,57** | 10,113 | 8,919 | **88,20** | 20,226 | 20,317 | **100,45** | 30,339 | 30,941 | **101,98** |
| 10 | 3,034 | 3,109 | **102,49** | 6,068 | 6,649 | **109,57** | 10,113 | 8,854 | **87,55** | 20,226 | 20,278 | **100,26** | 30,339 | 30,927 | **101,94** |
| 11 | 3,034 | 3,101 | **102,22** | 6,068 | 6,544 | **107,85** | 10,113 | 8,803 | **87,05** | 20,226 | 20,262 | **100,18** | 30,339 | 30,914 | **101,89** |
| 12 | 3,034 | 3,092 | **101,91** | 6,068 | 6,517 | **107,41** | 10,113 | 8,798 | **86,99** | 20,226 | 20,261 | **100,17** | 30,339 | 30,828 | **101,61** |
| 13 | 3,034 | 3,091 | **101,87** | 6,068 | 6,511 | **107,30** | 10,113 | 8,764 | **86,67** | 20,226 | 20,214 | **99,94** | 30,339 | 29,183 | **96,19** |
| 14 | 3,034 | 3,09 | **101,85** | 6,068 | 6,415 | **105,72** | 10,113 | 8,454 | **83,60** | 20,226 | 19,915 | **98,46** | 30,339 | 29,158 | **96,11** |
| 15 | 3,034 | 3,088 | **101,78** | 6,068 | 6,174 | **101,74** | 10,113 | 8,413 | **83,19** | 20,226 | 19,832 | **98,05** | 30,339 | 29,145 | **96,07** |
| 16 | 3,034 | 3,082 | **101,59** | 6,068 | 6,143 | **101,23** | 10,113 | 8,388 | **82,94** | 20,226 | 19,831 | **98,05** | 30,339 | 29,1 | **95,92** |
| 17 | 3,034 | 3,073 | **101,29** | 6,068 | 6,14 | **101,19** | 10,113 | 8,373 | **82,79** | 20,226 | 19,717 | **97,48** | 30,339 | 29,078 | **95,84** |
| 18 | 3,034 | 3,068 | **101,12** | 6,068 | 6,004 | **98,94** | 10,113 | 8,289 | **81,96** | 20,226 | 19,705 | **97,42** | 30,339 | 28,95 | **95,42** |

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de “x” de la ecuación de la recta de calibrado **y = 8571,4x – 3298** donde el valor de “y” corresponde a las ABC de las tablas 56 y 57 de este Anexo.

Tabla 60: Porcentaje de recuperación del método analítico para las distintas concentraciones (n = 3) en suero caprino.

| Concentración (µg/ml) | ABC agua | ABC suero | **Recuperación en suero (%)** |
|---|---|---|---|
| 0,037 | 741 | 730 | **98,52** |
| 0,037 | 757 | 717 | **94,72** |
| 0,037 | 829 | 828 | **99,87** |
| 0,121 | 1.688 | 1.489 | **88,22** |
| 0,121 | 1.786 | 1.251 | **70,04** |
| 0,121 | 1.666 | 1.433 | **86,01** |
| 6,068 | 57.590 | 55.057 | **95,60** |
| 6,068 | 56.920 | 54.004 | **94,88** |
| 6,068 | 57.810 | 53.689 | **92,87** |
| 10,113 | 85.266 | 74.449 | **87,31** |
| 10,113 | 85.382 | 74.202 | **86,91** |
| 10,113 | 84.491 | 72.155 | **85,40** |
| 20,226 | 179.363 | 171.179 | **95,44** |
| 20,226 | 179.845 | 170.516 | **94,81** |
| 20,226 | 177.110 | 169.961 | **95,96** |

### IX.1.2.- Validación de cefquinoma en leche

Tabla 61: Datos de las áreas bajo la curva (ABC) cromatográficas para el análisis de variación intra-día de cefquinoma en leche.

| Conc. (µg/ml) | ABC DIA 1 TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | CV (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,037 | 725 | 727 | 729 | 700 | 689 | 690 | **2,68** |
| 0,074 | 940 | 889 | 859 | 890 | 887 | 882 | **2,98** |
| 0,121 | 1.247 | 1.212 | 1.205 | 1.197 | 1.245 | 1.243 | **1,85** |
| 0,607 | 3.180 | 3.068 | 3.336 | 3.501 | 3.502 | 3.458 | **5,45** |
| 1,249 | 6.354 | 6.398 | 6212 | 7.278 | 6.912 | 6.825 | **6,14** |
| 3,034 | 21.707 | 21.610 | 19.796 | 18.942 | 18.625 | 17.569 | **8,48** |
| 6,068 | 47.085 | 46.875 | 46.834 | 41.898 | 41.052 | 40.985 | **7,02** |
| 10,113 | 71.947 | 70.792 | 68.423 | 68.951 | 69.956 | 70.541 | **1,83** |
| 20,226 | 165.535 | 164.969 | 164.938 | 164.469 | 154.998 | 153.980 | **3,37** |
| 30,339 | 243.777 | 234.346 | 233.864 | 231.415 | 230.589 | 230.365 | **2,16** |
| 55,989 | 468.195 | 450.954 | 402.569 | 410.256 | 398.656 | 378.956 | **8,14** |
| 176,978 | 1.376.355 | 1.375.438 | 1.373.695 | 1.298.568 | 1.348.796 | 1.456.892 | **3,74** |
| 353,956 | 2.928.335 | 2.848.676 | 2.715.686 | 2.896.547 | 2.866.559 | 2.778.456 | **2,77** |
| Conc. (µg/ml) | **ABC DIA 2** TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | **CV (%)** |
| 0,037 | 711 | 687 | 676 | 694 | 698 | 686 | **1,73** |
| 0,074 | 849 | 850 | 835 | 878 | 873 | 865 | **1,91** |
| 0,121 | 1.239 | 1.227 | 1.189 | 1.123 | 1.192 | 1.174 | **3,47** |
| 0,607 | 2.987 | 2.916 | 3.478 | 3.369 | 3.354 | 3.265 | **7** |
| 1,249 | 6.402 | 6.262 | 6654 | 6689 | 6526 | 6300 | **2,78** |
| 3,034 | 17.823 | 17.560 | 17.463 | 17.265 | 17.121 | 17.489 | **1,39** |
| 6,068 | 40.351 | 42.663 | 42.589 | 42.647 | 41.965 | 45.850 | **4,19** |
| 10,113 | 64.673 | 63.631 | 62.999 | 61.335 | 69.584 | 69.001 | **5,14** |
| 20,226 | 155.365 | 155.698 | 162.841 | 160.098 | 156.375 | 154.101 | **2,12** |
| 30,339 | 235.265 | 236.982 | 233.432 | 232.886 | 232.101 | 229.573 | **1,1** |
| 55,989 | 444.879 | 389.654 | 399.650 | 445.129 | 438.954 | 429.871 | **5,68** |
| 176,978 | 1.436.088 | 1.415.833 | 1.425.214 | 1.376.522 | 1.376.320 | 1.365.236 | **2,15** |
| 353,956 | 2.766.430 | 2.748.637 | 2.733.717 | 2.904.587 | 2.895.564 | 2.759.880 | **2,76** |
| Conc. (µg/ml) | **ABC DIA 3** TIEMPO 1 | | TIEMPO 2 | | TIEMPO 3 | | **CV (%)** |
| 0,037 | 712 | 719 | 722 | 720 | 643 | 634 | **5,99** |
| 0,074 | 862 | 860 | 851 | 843 | 794 | 792 | **3,87** |
| 0,121 | 1.186 | 1.179 | 1.165 | 1.072 | 1.070 | 1.043 | **5,73** |
| 0,607 | 3.255 | 3.216 | 3.289 | 3.508 | 2.811 | 2.745 | **9,46** |
| 1,249 | 6256 | 6245 | 6352 | 6.374 | 6.712 | 6.550 | **2,84** |
| 3,034 | 18.036 | 17.965 | 20.117 | 18.322 | 17.996 | 17.829 | **4,72** |
| 6,068 | 40.698 | 43.259 | 44.656 | 46.589 | 41.317 | 41.085 | **5,46** |
| 10,113 | 65.895 | 67.541 | 68.409 | 66.620 | 65.422 | 64.749 | **2,05** |
| 20,226 | 152.487 | 152.800 | 153.620 | 153.062 | 151.300 | 150.109 | **0,85** |
| 30,339 | 230.458 | 236.748 | 219.356 | 217.399 | 226.662 | 222.125 | **3,24** |
| 55,989 | 438.830 | 472.659 | 426.300 | 437.895 | 465.098 | 464.089 | **4,17** |
| 176,978 | 1.364.126 | 1.291.258 | 1.305.698 | 1.325.941 | 1.405.423 | 1.387.829 | **3,42** |
| 353,956 | 2.793.541 | 2.725.498 | 2.952.355 | 2.842.354 | 2.841.740 | 2.798.519 | **2,67** |

Tabla 62: Datos de las áreas bajo la curva (ABC) cromatográficas para el análisis de variación inter-día de cefquinoma en leche.

| Conc. (µg/ml) | 0,04 | 0,07 | 0,12 | 0,61 | 1,25 | 3,034 | 6,068 | 10,11 | 20,226 | 30,339 | 55,989 | 176,978 | 353,956 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ABC DIA 1 | 725 | 940 | 1.247 | 3.180 | 6.354 | 21.707 | 47.085 | 71.947 | 165.535 | 243.777 | 468.195 | 1.376.355 | 2.928.335 |
| | 727 | 889 | 1.212 | 3.068 | 6.398 | 21.610 | 46.875 | 70.792 | 164.969 | 234.346 | 450.954 | 1.375.438 | 2.848.676 |
| | 729 | 859 | 1.205 | 3.336 | 6212 | 19.796 | 46.834 | 68.423 | 164.938 | 233.864 | 402.569 | 1.373.695 | 2.715.686 |
| | 700 | 890 | 1.197 | 3.501 | 7.278 | 18.942 | 41.898 | 68.951 | 164.469 | 231.415 | 410.256 | 1.298.568 | 2.896.547 |
| | 689 | 887 | 1.245 | 3.502 | 6.912 | 18.625 | 41.052 | 69.956 | 154.998 | 230.589 | 398.656 | 1.348.796 | 2.866.559 |
| | 690 | 882 | 1.243 | 3.458 | 6.825 | 17.569 | 40.985 | 70.541 | 153.980 | 230.365 | 378.956 | 1.456.892 | 2.778.456 |
| ABC DIA 2 | 711 | 849 | 1.239 | 2.987 | 6.402 | 17.823 | 40.351 | 64.673 | 155.365 | 235.265 | 444.879 | 1.436.088 | 2.766.430 |
| | 687 | 850 | 1.227 | 2.916 | 6.262 | 17.560 | 42.663 | 63.631 | 155.698 | 236.982 | 389.654 | 1.415.833 | 2.748.637 |
| | 676 | 835 | 1.189 | 3.478 | 6654 | 17.463 | 42.589 | 62.999 | 162.841 | 233.432 | 399.650 | 1.425.214 | 2.733.717 |
| | 694 | 878 | 1.123 | 3.369 | 6689 | 17.265 | 42.647 | 61.335 | 160.098 | 232.886 | 445.129 | 1.376.522 | 2.904.587 |
| | 698 | 873 | 1.192 | 3.354 | 6526 | 17.121 | 41.965 | 69.584 | 156.375 | 232.101 | 438.954 | 1.376.320 | 2.895.564 |
| | 686 | 865 | 1.174 | 3.265 | 6300 | 17.489 | 45.850 | 69.001 | 154.101 | 229.573 | 429.871 | 1.365.236 | 2.759.880 |
| ABC DIA 3 | 712 | 862 | 1.186 | 3.255 | 6256 | 18.036 | 40.698 | 65.895 | 152.487 | 230.458 | 438.830 | 1.364.126 | 2.793.541 |
| | 719 | 860 | 1.179 | 3.216 | 6245 | 17.965 | 43.259 | 67.541 | 152.800 | 236.748 | 472.659 | 1.291.258 | 2.725.498 |
| | 722 | 851 | 1.165 | 3.289 | 6352 | 20.117 | 44.656 | 68.409 | 153.620 | 219.356 | 426.300 | 1.305.698 | 2.952.355 |
| | 720 | 843 | 1.072 | 3.508 | 6.374 | 18.322 | 46.589 | 66.620 | 153.062 | 217.399 | 437.895 | 1.325.941 | 2.842.354 |
| | 643 | 794 | 1.070 | 2.811 | 6.712 | 17.996 | 41.317 | 65.422 | 151.300 | 226.662 | 465.098 | 1.405.423 | 2.841.740 |
| | 634 | 792 | 1.043 | 2.745 | 6.550 | 17.829 | 41.085 | 64.749 | 150.109 | 222.125 | 464.089 | 1.387.829 | 2.798.519 |
| **C.V. (%)** | **3,87** | **3,99** | **5,31** | **7,44** | **4,35** | **7,57** | **5,57** | **4,44** | **3,35** | **2,78** | **6,67** | **3,38** | **2,63** |

Tabla 63: Exactitud de la técnica analítica (HPLC) para concentraciones de cefquinoma en leche, entre 0,037 a 1,249 µg/ml

| Inyecc. HPLC | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,037 | 0,044 | **119,79** | 0,074 | 0,089 | **119,72** | 0,121 | 0,144 | **118,91** | 0,607 | 0,561 | **92,460** | 1,249 | 1,229 | **98,44** |
| 2 | 0,037 | 0,043 | **116,83** | 0,074 | 0,079 | **106,56** | 0,121 | 0,144 | **118,75** | 0,607 | 0,538 | **88,570** | 1,249 | 1,239 | **99,18** |
| 3 | 0,037 | 0,044 | **119,25** | 0,074 | 0,073 | **98,02** | 0,121 | 0,145 | **119,87** | 0,607 | 0,521 | **85,760** | 1,249 | 1,234 | **98,78** |
| 4 | 0,037 | 0,041 | **111,82** | 0,074 | 0,071 | **95,46** | 0,121 | 0,144 | **118,76** | 0,607 | 0,506 | **83,300** | 1,249 | 1,424 | **114,01** |
| 5 | 0,037 | 0,036 | **98,17** | 0,074 | 0,07 | **95,18** | 0,121 | 0,143 | **117,89** | 0,607 | 0,486 | **80,070** | 1,249 | 1,347 | **107,85** |
| 6 | 0,037 | 0,034 | **91,91** | 0,074 | 0,067 | **91,19** | 0,121 | 0,139 | **114,76** | 0,607 | 0,488 | **80,420** | 1,249 | 1,329 | **106,38** |
| 7 | 0,037 | 0,03 | **81,10** | 0,074 | 0,059 | **80,10** | 0,121 | 0,128 | **105,89** | 0,607 | 0,594 | **97,870** | 1,249 | 1,305 | **104,47** |
| 8 | 0,037 | 0,03 | **80,53** | 0,074 | 0,059 | **80,38** | 0,121 | 0,117 | **97,01** | 0,607 | 0,629 | **103,590** | 1,249 | 1,271 | **101,74** |
| 9 | 0,037 | 0,039 | **105,56** | 0,074 | 0,079 | **106,84** | 0,121 | 0,117 | **96,66** | 0,607 | 0,629 | **103,630** | 1,249 | 1,24 | **99,25** |
| 10 | 0,037 | 0,037 | **99,30** | 0,074 | 0,078 | **105,99** | 0,121 | 0,111 | **91,96** | 0,607 | 0,62 | **102,100** | 1,249 | 1,21 | **96,89** |
| 11 | 0,037 | 0,037 | **99,87** | 0,074 | 0,077 | **104,57** | 0,121 | 0,145 | **120,03** | 0,607 | 0,624 | **102,790** | 1,249 | 1,293 | **103,50** |
| 12 | 0,037 | 0,038 | **102,15** | 0,074 | 0,077 | **103,43** | 0,121 | 0,145 | **119,86** | 0,607 | 0,601 | **99,010** | 1,249 | 1,3 | **104,09** |
| 13 | 0,037 | 0,039 | **104,43** | 0,074 | 0,075 | **102,01** | 0,121 | 0,145 | **120,04** | 0,607 | 0,598 | **98,490** | 1,249 | 1,266 | **101,34** |
| 14 | 0,037 | 0,036 | **97,60** | 0,074 | 0,074 | **99,73** | 0,121 | 0,145 | **119,84** | 0,607 | 0,579 | **95,410** | 1,249 | 1,218 | **97,53** |
| 15 | 0,037 | 0,042 | **112,39** | 0,074 | 0,073 | **98,88** | 0,121 | 0,142 | **117,37** | 0,607 | 0,577 | **95,060** | 1,249 | 1,2 | **96,05** |
| 16 | 0,037 | 0,043 | **116,38** | 0,074 | 0,073 | **98,31** | 0,121 | 0,141 | **116,85** | 0,607 | 0,569 | **93,710** | 1,249 | 1,209 | **96,79** |
| 17 | 0,037 | 0,044 | **118,08** | 0,074 | 0,071 | **95,75** | 0,121 | 0,14 | **115,63** | 0,607 | 0,584 | **96,240** | 1,249 | 1,207 | **96,60** |
| 18 | 0,037 | 0,043 | **116,95** | 0,074 | 0,069 | **93,47** | 0,121 | 0,137 | **113,19** | 0,607 | 0,63 | **103,840** | 1,249 | 1,229 | **98,41** |

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de “x” de la ecuación de la recta de calibrado **y = 4749,5x + 514,49** donde el valor de “y” corresponde a las ABC de las tablas 61 y 62 de este Anexo.

Tabla 64: Exactitud de la técnica analítica (HPLC) para concentraciones de cefquinoma en leche, entre 3,034 a 30,339 µg/ml

| Inyecc. HPLC | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,034 | 3,455 | **113,87** | 6,068 | 6,701 | **110,43** | 10,113 | 9,88 | **97,70** | 20,226 | 21,85 | **108,03** | 30,339 | 31,857 | **105,00** |
| 2 | 3,034 | 3,442 | **113,46** | 6,068 | 6,674 | **109,98** | 10,113 | 9,733 | **96,24** | 20,226 | 21,778 | **107,67** | 30,339 | 30,651 | **101,03** |
| 3 | 3,034 | 3,252 | **107,17** | 6,068 | 6,669 | **109,90** | 10,113 | 9,43 | **93,24** | 20,226 | 21,774 | **107,65** | 30,339 | 30,589 | **100,82** |
| 4 | 3,034 | 3,21 | **105,82** | 6,068 | 6,543 | **107,82** | 10,113 | 9,428 | **93,23** | 20,226 | 21,714 | **107,36** | 30,339 | 30,534 | **100,64** |
| 5 | 3,034 | 3,101 | **102,22** | 6,068 | 5,963 | **98,27** | 10,113 | 9,199 | **90,96** | 20,226 | 21,505 | **106,33** | 30,339 | 30,464 | **100,41** |
| 6 | 3,034 | 3,061 | **100,88** | 6,068 | 5,933 | **97,78** | 10,113 | 9,046 | **89,45** | 20,226 | 21,155 | **104,59** | 30,339 | 30,364 | **100,08** |
| 7 | 3,034 | 3,022 | **99,60** | 6,068 | 5,839 | **96,23** | 10,113 | 8,96 | **88,60** | 20,226 | 20,678 | **102,24** | 30,339 | 30,04 | **99,02** |
| 8 | 3,034 | 2,98 | **98,23** | 6,068 | 6,135 | **101,11** | 10,113 | 8,95 | **88,50** | 20,226 | 20,388 | **100,80** | 30,339 | 29,668 | **97,79** |
| 9 | 3,034 | 2,959 | **97,52** | 6,068 | 6,126 | **100,95** | 10,113 | 8,817 | **87,18** | 20,226 | 20,326 | **100,50** | 30,339 | 29,088 | **95,88** |
| 10 | 3,034 | 2,958 | **97,50** | 6,068 | 6,133 | **101,07** | 10,113 | 8,736 | **86,38** | 20,226 | 20,255 | **100,14** | 30,339 | 28,734 | **94,71** |
| 11 | 3,034 | 2,924 | **96,39** | 6,068 | 6,046 | **99,63** | 10,113 | 8,523 | **84,28** | 20,226 | 20,029 | **99,03** | 30,339 | 28,483 | **93,88** |
| 12 | 3,034 | 2,912 | **95,98** | 6,068 | 6,037 | **99,49** | 10,113 | 9,578 | **94,71** | 20,226 | 19,877 | **98,27** | 30,339 | 30,142 | **99,35** |
| 13 | 3,034 | 2,887 | **95,15** | 6,068 | 5,929 | **97,71** | 10,113 | 9,504 | **93,97** | 20,226 | 20,549 | **101,60** | 30,339 | 30,768 | **101,41** |
| 14 | 3,034 | 2,868 | **94,54** | 6,068 | 5,92 | **97,57** | 10,113 | 9,497 | **93,91** | 20,226 | 20,592 | **101,81** | 30,339 | 30,988 | **102,14** |
| 15 | 3,034 | 2,926 | **96,43** | 6,068 | 5,884 | **96,96** | 10,113 | 9,626 | **95,18** | 20,226 | 20,502 | **101,37** | 30,339 | 30,276 | **99,79** |
| 16 | 3,034 | 2,915 | **96,09** | 6,068 | 6,211 | **102,36** | 10,113 | 9,701 | **95,92** | 20,226 | 20,372 | **100,72** | 30,339 | 30,17 | **99,44** |
| 17 | 3,034 | 2,985 | **98,40** | 6,068 | 6,39 | **105,31** | 10,113 | 9,106 | **90,05** | 20,226 | 20,181 | **99,78** | 30,339 | 30,153 | **99,39** |
| 18 | 3,034 | 2,976 | **98,10** | 6,068 | 6,637 | **109,38** | 10,113 | 9,317 | **92,13** | 20,226 | 20,221 | **99,98** | 30,339 | 30,958 | **102,04** |

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de “x” de la ecuación de la recta de calibrado **y = 7818,8x - 5305,9** donde el valor de “y” corresponde a las ABC de las tablas 61 y 62 de este Anexo.

Tabla 65: Exactitud de la técnica analítica (HPLC) para concentraciones de cefquinoma en leche, entre 3,034 a 30,339 µg/ml

| Inyecc. HPLC | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** | CONC teor (µg/ml) | CONC exp (µg/ml) | **Exact. (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 55,989 | 61,101 | 109,13 | 176,978 | 182,042 | 102,86 | 353,956 | 368,503 | 104,11 |
| 2 | 55,989 | 58,947 | 105,28 | 176,978 | 179,511 | 101,43 | 353,956 | 358,549 | 101,30 |
| 3 | 55,989 | 58,187 | 103,93 | 176,978 | 178,210 | 100,70 | 353,956 | 357,683 | 101,05 |
| 4 | 55,989 | 57,432 | 102,58 | 176,978 | 176,012 | 99,45 | 353,956 | 352,282 | 99,53 |
| 5 | 55,989 | 61,659 | 110,13 | 176,978 | 174,578 | 98,64 | 353,956 | 348,273 | 98,39 |
| 6 | 55,989 | 52,901 | 94,48 | 176,978 | 174,464 | 98,58 | 353,956 | 346,049 | 97,77 |
| 7 | 55,989 | 53,861 | 96,20 | 176,978 | 174,246 | 98,46 | 353,956 | 344,185 | 97,24 |
| 8 | 55,989 | 52,412 | 93,61 | 176,978 | 164,859 | 93,15 | 353,956 | 341,932 | 96,60 |
| 9 | 55,989 | 49,950 | 89,21 | 176,978 | 171,135 | 96,70 | 353,956 | 364,531 | 102,99 |
| 10 | 55,989 | 51,287 | 91,60 | 176,978 | 184,642 | 104,33 | 353,956 | 360,784 | 101,93 |
| 11 | 55,989 | 52,536 | 93,83 | 176,978 | 180,683 | 102,09 | 353,956 | 349,775 | 98,82 |
| 12 | 55,989 | 58,219 | 103,98 | 176,978 | 173,050 | 97,78 | 353,956 | 365,536 | 103,27 |
| 13 | 55,989 | 57,447 | 102,60 | 176,978 | 163,945 | 92,64 | 353,956 | 364,408 | 102,95 |
| 14 | 55,989 | 56,312 | 100,58 | 176,978 | 165,749 | 93,66 | 353,956 | 347,454 | 98,16 |
| 15 | 55,989 | 55,866 | 99,78 | 176,978 | 168,279 | 95,08 | 353,956 | 351,660 | 99,35 |
| 16 | 55,989 | 57,315 | 102,37 | 176,978 | 174,599 | 98,66 | 353,956 | 343,158 | 96,95 |
| 17 | 55,989 | 60,714 | 108,44 | 176,978 | 174,574 | 98,64 | 353,956 | 371,504 | 104,96 |
| 18 | 55,989 | 60,588 | 108,21 | 176,978 | 173,189 | 97,86 | 353,956 | 357,759 | 101,07 |

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de “x” de la ecuación de la recta de calibrado **y = 8003x – 20795** donde el valor de “y” corresponde a las ABC de las tablas 61 y 62 de este Anexo**.**

Tabla 66: Porcentaje de recuperación del método analítico para las distintas concentraciones (n = 3) en leche caprina.

| Concentración (µg/ml) | ABC agua | ABC leche | **Recuperación en leche (%)** |
|---|---|---|---|
| 0,037 | 741 | 711 | **95,95** |
| 0,037 | 757 | 676 | **89,30** |
| 0,037 | 829 | 698 | **84,20** |
| 0,121 | 1.688 | 1.239 | **73,41** |
| 0,121 | 1.786 | 1.189 | **66,57** |
| 0,121 | 1.666 | 1.192 | **71,55** |
| 6,068 | 57.590 | 40.351 | **70,07** |
| 6,068 | 56.920 | 42.589 | **74,82** |
| 6,068 | 57.810 | 41.965 | **72,59** |
| 10,113 | 85.266 | 64.673 | **75,85** |
| 10,113 | 85.382 | 62.999 | **73,78** |
| 10,113 | 84.491 | 69.584 | **82,36** |
| 20,226 | 179.363 | 155.365 | **86,62** |
| 20,226 | 179.845 | 162.841 | **90,55** |
| 20,226 | 177.110 | 156.375 | **88,29** |

## IX.2.- Etapa IV: farmacocinética de cefquinoma en cabritos

Tabla 67: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabritos de **3 días** de edad.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 6,377 | 9,089 | 9,090 | 6,938 | 8,668 | 8,349 | 8,085 ± 1,154 |
| 0,10 | 5,153 | 7,689 | 8,189 | 6,372 | 7,382 | 6,231 | 6,836 ± 1,120 |
| 0,20 | 4,719 | 6,109 | 6,680 | 5,624 | 6,374 | 5,497 | 5,834 ± 0,705 |
| 0,33 | 4,061 | 5,598 | 5,973 | 5,082 | 5,795 | 4,919 | 5,238 ± 0,706 |
| 0,50 | 3,808 | 5,065 | 5,308 | 4,511 | 4,966 | 4,590 | 4,708 ± 0,532 |
| 0,75 | 3,371 | 4,311 | 4,757 | 3,931 | 4,474 | 4,107 | 4,158 ± 0,481 |
| 1,00 | 3,031 | 3,678 | 4,203 | 3,423 | 3,819 | 3,808 | 3,660 ± 0,399 |
| 1,50 | 2,311 | 2,893 | 3,276 | 2,686 | 2,705 | 3,138 | 2,835 ± 0,347 |
| 2,00 | 1,828 | 2,213 | 2,469 | 2,049 | 2,264 | 2,573 | 2,233 ± 0,272 |
| 3,00 | 1,325 | 1,466 | 1,401 | 1,215 | 1,380 | 1,653 | 1,407 ± 0,147 |
| 4,00 | 0,882 | 1,103 | 0,993 | 0,758 | 0,773 | 1,204 | 0,952 ± 0,180 |
| 6,00 | 0,469 | 0,451 | 0,393 | 0,373 | 0,373 | 0,546 | 0,434 ± 0,068 |
| 8,00 | 0,260 | 0,208 | 0,232 | 0,200 | 0,178 | 0,322 | 0,233 ± 0,052 |
| 10,00 | 0,222 | 0,111 | 0,132 | 0,095 | 0,102 | 0,097 | 0,126 ± 0,049 |
| 12,00 | LOQ | LOQ | ND | ND | LOQ | LOQ | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 68: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabritos de **10 días** de edad.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 9,229 | 8,239 | 9,380 | 7,914 | 8,742 | 9,146 | 8,775 ± 0,590 |
| 0,10 | 7,058 | 6,649 | 7,209 | 6,407 | 6,652 | 7,299 | 6,879 ± 0,359 |
| 0,20 | 5,820 | 5,528 | 6,029 | 5,744 | 5,594 | 6,194 | 5,818 ± 0,255 |
| 0,33 | 4,703 | 4,432 | 4,932 | 5,004 | 4,921 | 5,313 | 4,884 ± 0,296 |
| 0,50 | 4,017 | 3,978 | 4,201 | 4,473 | 4,203 | 4,687 | 4,260 ± 0,273 |
| 0,75 | 3,456 | 3,493 | 3,524 | 3,907 | 3,610 | 3,909 | 3,650 ± 0,206 |
| 1,00 | 3,017 | 3,138 | 3,038 | 3,339 | 3,012 | 3,302 | 3,141 ± 0,147 |
| 1,50 | 2,393 | 2,611 | 2,309 | 2,507 | 2,334 | 2,649 | 2,467 ± 0,144 |
| 2,00 | 1,876 | 2,151 | 1,767 | 1,961 | 1,862 | 2,175 | 1,965 ± 0,165 |
| 3,00 | 1,114 | 1,489 | 1,050 | 1,157 | 1,095 | 1,480 | 1,231 ± 0,200 |
| 4,00 | 0,703 | 0,983 | 0,668 | 0,719 | 0,717 | 1,043 | 0,805 ± 0,163 |
| 6,00 | 0,418 | 0,372 | 0,289 | 0,330 | 0,311 | 0,501 | 0,370 ± 0,079 |
| 8,00 | 0,251 | 0,158 | 0,192 | 0,171 | 0,158 | 0,222 | 0,192 ± 0,038 |
| 10,00 | 0,160 | ND | 0,107 | LOQ | 0,090 | 0,106 | 0,116 ± 0,030 |
| 12,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 69: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabritos de **24 días** de edad.

| TIEMPO | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (h) | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 8,444 | 7,889 | 8,351 | 9,207 | 8,529 | 8,974 | 8,566 ± 0,469 |
| 0,10 | 5,885 | 5,891 | 6,545 | 6,566 | 6,528 | 6,704 | 6,353 ± 0,365 |
| 0,20 | 4,626 | 4,976 | 5,405 | 5,339 | 5,410 | 5,478 | 5,206 ± 0,335 |
| 0,33 | 4,085 | 4,328 | 4,433 | 4,579 | 4,811 | 4,547 | 4,464 ± 0,246 |
| 0,50 | 3,689 | 3,748 | 3,720 | 4,016 | 3,878 | 4,028 | 3,847 ± 0,151 |
| 0,75 | 3,218 | 3,076 | 3,005 | 3,076 | 3,067 | 3,355 | 3,133 ± 0,129 |
| 1,00 | 2,840 | 2,589 | 2,376 | 2,670 | 2,560 | 2,897 | 2,655 ± 0,192 |
| 1,50 | 1,988 | 2,040 | 1,518 | 1,720 | 1,813 | 2,066 | 1,858 ± 0,215 |
| 2,00 | 1,674 | 1,581 | 1,055 | 1,031 | 1,231 | 1,568 | 1,357 ± 0,286 |
| 3,00 | 1,112 | 1,023 | 0,417 | 0,492 | 0,501 | 0,875 | 0,737 ± 0,303 |
| 4,00 | 0,727 | 0,620 | 0,277 | 0,223 | 0,236 | 0,457 | 0,423 ± 0,214 |
| 6,00 | 0,232 | 0,192 | 0,092 | 0,099 | 0,096 | 0,150 | 0,144 ± 0,059 |
| 8,00 | 0,083 | 0,086 | ND | ND | ND | 0,065 | 0,078 ± 0,012 |
| 10,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 12,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado.

Tabla 70: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV a seis cabritos de **50 días** de edad.

| TIEMPO | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (h) | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 10,464 | 10,287 | 10,958 | 11,296 | 10,834 | 8,680 | 10,420 ± 0,925 |
| 0,10 | 7,395 | 7,722 | 9,019 | 8,178 | 8,006 | 7,307 | 7,938 ± 0,628 |
| 0,20 | 5,717 | 5,681 | 7,036 | 6,373 | 6,061 | 5,993 | 6,144 ± 0,505 |
| 0,33 | 4,750 | 4,697 | 5,759 | 5,123 | 4,808 | 5,156 | 5,049 ± 0,398 |
| 0,50 | 4,109 | 4,119 | 4,820 | 4,166 | 3,985 | 4,321 | 4,253 ± 0,298 |
| 0,75 | 3,305 | 3,336 | 3,818 | 3,232 | 3,148 | 3,601 | 3,407 ± 0,253 |
| 1,00 | 2,897 | 2,860 | 2,947 | 2,531 | 2,558 | 3,017 | 2,802 ± 0,206 |
| 1,50 | 2,159 | 2,024 | 1,890 | 1,760 | 1,891 | 2,031 | 1,959 ± 0,140 |
| 2,00 | 1,581 | 1,451 | 1,214 | 1,185 | 1,295 | 1,472 | 1,366 ± 0,159 |
| 3,00 | 0,903 | 0,790 | 0,496 | 0,532 | 0,625 | 0,735 | 0,680 ± 0,157 |
| 4,00 | 0,577 | 0,485 | 0,289 | 0,266 | 0,279 | 0,392 | 0,381 ± 0,128 |
| 6,00 | 0,178 | 0,129 | 0,129 | 0,084 | 0,095 | 0,116 | 0,122 ± 0,033 |
| 8,00 | ND | ND | ND | ND | ND | LOQ | - |
| 10,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 12,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 71: Concentraciones séricas de cefquinoma por animal luego de la administración de 2 mg/kg por la vía IV. a seis cabritos de **80 días** de edad.

| TIEMPO (h) | Concentración sérica (µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
| 0,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 0,03 | 9,019 | 10,453 | 11,285 | 11,093 | 11,496 | 11,541 | 10,814 ± 0,964 |
| 0,10 | 6,980 | 7,824 | 9,016 | 8,693 | 8,827 | 9,140 | 8,413 ± 0,842 |
| 0,20 | 5,296 | 5,700 | 6,874 | 6,403 | 6,523 | 7,038 | 6,306 ± 0,679 |
| 0,33 | 4,213 | 4,557 | 5,152 | 4,980 | 5,257 | 5,463 | 4,937 ± 0,468 |
| 0,50 | 3,592 | 3,714 | 4,550 | 3,939 | 4,355 | 4,490 | 4,107 ± 0,413 |
| 0,75 | 2,815 | 2,905 | 3,546 | 2,988 | 3,302 | 3,684 | 3,207 ± 0,359 |
| 1,00 | 2,236 | 2,185 | 2,951 | 2,453 | 2,781 | 3,076 | 2,614 ± 0,376 |
| 1,50 | 1,464 | 1,312 | 1,934 | 1,710 | 2,008 | 2,250 | 1,780 ± 0,352 |
| 2,00 | 0,917 | 0,894 | 1,308 | 1,192 | 1,501 | 1,633 | 1,241 ± 0,301 |
| 3,00 | 0,452 | 0,578 | 0,591 | 0,670 | 0,802 | 0,914 | 0,668 ± 0,167 |
| 4,00 | 0,250 | 0,392 | 0,335 | 0,376 | 0,398 | 0,437 | 0,365 ± 0,065 |
| 6,00 | 0,084 | 0,108 | 0,086 | 0,086 | 0,106 | 0,158 | 0,105 ± 0,028 |
| 8,00 | ND | ND | ND | ND | LOQ | 0,083 | - |
| 10,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 12,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 24,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 36,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |
| 48,00 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - |

ND: no detectado; LOQ: debajo del límite de cuantificación.

Tabla 72: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabritos de **3 días** de edad.

| Parámetro | Unidad | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,24 | 0,38 | 0,33 | 0,34 | 0,34 | 0,39 | 0,34 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 2,93 | 1,82 | 2,11 | 2,02 | 2,03 | 1,78 | 2,12 ± 0,42 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 6,38 | 9,09 | 9,09 | 6,94 | 8,67 | 8,35 | 8,09 ± 1,15 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 11,62 | 13,95 | 14,58 | 12,08 | 13,16 | 14,62 | 13,34 ± 1,27 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 12,56 | 14,25 | 14,98 | 12,36 | 13,46 | 14,87 | 13,75 ± 1,14 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 41,64 | 33,26 | 34,86 | 28,43 | 29,72 | 37,32 | 34,20 ± 4,89 |
| TMR | h | 3,31 | 2,33 | 2,33 | 2,30 | 2,21 | 2,51 | 2,50 ± 0,41 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 673,33 | 369,51 | 405,58 | 472,05 | 435,87 | 345,70 | 450 ± 118,23 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 527,81 | 327,82 | 310,51 | 372,07 | 327,97 | 337,54 | 367,29 ± 81,24 |
| Cl | ml·kg/h | 159,22 | 140,40 | 133,48 | 161,79 | 148,57 | 134,50 | 146,32 ± 12,25 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 73: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabritos de **10 días** de edad.

| Parámetro | Unidad | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,25 | 0,44 | 0,30 | 0,36 | 0,35 | 0,38 | 0,34 ± 0,07 |
| $T½\lambda_e$ | h | 2,80 | 1,56 | 2,35 | 1,93 | 2,01 | 1,83 | 2,08 ± 0,44 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 9,23 | 10,95 | 9,38 | 7,91 | 8,74 | 9,15 | 9,23 ± 1,00 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 11,65 | 12,05 | 11,13 | 11,41 | 11,16 | 13,45 | 11,81 ± 0,88 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 12,30 | 12,40 | 11,49 | 11,89 | 11,42 | 13,73 | 12,21 ± 0,85 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 34,52 | 27,60 | 26,70 | 25,97 | 25,34 | 33,04 | 28,86 ± 3,91 |
| TMR | h | 2,81 | 2,23 | 2,32 | 2,18 | 2,22 | 2,41 | 2,36 ± 0,23 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 657,04 | 364,00 | 589,72 | 468,42 | 507,16 | 383,69 | 495,01 ± 114,57 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 456,64 | 358,86 | 404,66 | 367,45 | 388,41 | 350,37 | 387,73 ± 39,18 |
| Cl | ml·kg/h | 162,66 | 161,26 | 174,10 | 168,22 | 175,08 | 145,62 | 164,49 ± 10,85 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 74: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabritos de **24 días** de edad.

| Parámetro | Unidad | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,50 | 0,50 | 0,51 | 0,52 | 0,54 | 0,54 | 0,52 ± 0,02 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,40 | 1,39 | 1,36 | 1,34 | 1,29 | 1,29 | 1,34 ± 0,05 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 8,44 | 7,89 | 8,35 | 9,21 | 8,53 | 8,97 | 8,57 ± 0,47 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 9,82 | 9,38 | 7,26 | 7,60 | 7,75 | 9,34 | 8,53 ± 1,11 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 9,99 | 9,55 | 7,44 | 7,79 | 7,93 | 9,46 | 8,70 ± 1,09 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 19,25 | 17,74 | 9,88 | 10,19 | 10,48 | 15,34 | 13,81 ± 4,17 |
| TMR | h | 1,93 | 1,86 | 1,33 | 1,31 | 1,32 | 1,62 | 1,56 ± 0,28 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 403,11 | 419,99 | 526,14 | 497,06 | 470,18 | 394,18 | 451,78 ± 54,06 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 385,94 | 388,75 | 356,44 | 335,27 | 333,38 | 342,62 | 357,07 ± 24,83 |
| Cl | ml·kg/h | 200,25 | 209,34 | 268,66 | 256,58 | 252,21 | 211,32 | 233,06 ± 29,32 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 75: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabritos de **50 días** de edad.

| Parámetro | Unidad | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,55 | 0,61 | 0,54 | 0,65 | 0,67 | 0,66 | 0,61 ± 0,06 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,26 | 1,14 | 1,28 | 1,06 | 1,03 | 1,06 | 1,14 ± 0,11 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 10,46 | 10,29 | 10,96 | 11,30 | 10,83 | 9,03 | 10,48 ± 0,80 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 9,66 | 9,19 | 9,12 | 8,31 | 8,43 | 9,15 | 8,98 ± 0,51 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 9,99 | 9,40 | 9,36 | 8,44 | 8,57 | 9,33 | 9,18 ± 0,58 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 16,34 | 13,94 | 11,97 | 10,24 | 10,97 | 13,05 | 12,75 ± 2,21 |
| TMR | h | 1,64 | 1,48 | 1,28 | 1,21 | 1,28 | 1,40 | 1,38 ± 0,16 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 363,63 | 349,51 | 395,16 | 361,99 | 347,78 | 327,30 | 357,56 ± 22,57 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 327,59 | 315,50 | 273,48 | 287,55 | 298,93 | 299,91 | 300,49 ± 19,28 |
| Cl | ml·kg/h | 200,25 | 212,73 | 213,73 | 237,01 | 233,46 | 214,43 | 218,6 ± 13,94 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

Tabla 76: Parámetros farmacocinéticos tras la administración de 2 mg/kg de cefquinoma, vía IV, en seis cabritos de **80 días** de edad.

| Parámetro | Unidad | J | A | V | I | E | R | MEDIA ± D.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\lambda_e$ | $h^{-1}$ | 0,62 | 0,53 | 0,67 | 0,66 | 0,65 | 0,60 | 0,62 ± 0,05 |
| $T½\lambda_e$ | h | 1,11 | 1,30 | 1,03 | 1,06 | 1,06 | 1,15 | 1,12 ± 0,10 |
| $C_{max}$ | µg/ml | 9,02 | 10,45 | 11,28 | 12,11 | 13,11 | 12,13 | 11,35 ± 1,45 |
| $ABC_{0-t}$ | µg·h/ml | 7,03 | 7,59 | 9,11 | 8,52 | 9,48 | 10,49 | 8,70 ± 1,27 |
| ABC∞ | µg·h/ml | 7,16 | 7,79 | 9,24 | 8,65 | 9,64 | 10,63 | 8,85 ± 1,26 |
| ABMC∞ | $\mu g \cdot h^2/ml$ | 9,00 | 10,84 | 11,43 | 11,22 | 13,03 | 16,24 | 11,96 ± 2,46 |
| TMR | h | 1,26 | 1,39 | 1,24 | 1,30 | 1,35 | 1,53 | 1,34 ± 0,11 |
| $Vd_{area}$ | ml/kg | 446,93 | 480,02 | 322,74 | 352,03 | 317,19 | 312,94 | 371,97 ± 72,94 |
| $Vd_{ss}$ | ml/kg | 350,76 | 357,15 | 267,85 | 299,70 | 280,56 | 287,48 | 307,25 ± 37,67 |
| Cl | ml·kg/h | 279,15 | 256,68 | 216,51 | 231,18 | 207,52 | 188,17 | 229,87 ± 33,36 |

$\lambda_e$: constante de eliminación; $T½\lambda_e$: semivida de eliminación; $C_{max}$: concentración máxima; $ABC_{0-t}$: área bajo la curva calculada al tiempo final observado; ABC∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; ABMC∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{area}$: volumen aparente de distribución calculado por el método del área; $Vd_{ss}$; volumen aparente de distribución en el estado estacionario; Cl: aclaramiento plasmático.

## IX.3.- Parámetros integrados farmacocinéticos y farmacodinámicos

Tabla 77: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de la **etapa I (cabras adultas vacías)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por las vías intravenosa e intramuscular.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa** T > CIM (h) / animal | | | | | | | **Vía intramuscular** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **A** | **B** | **C** | **D** | **H** | **W** | **MEDIA ± D.E.** | **A** | **B** | **C** | **D** | **H** | **W** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 6,8 | 6,9 | 6,8 | 7,3 | 6,4 | 6,4 | 6,8 ± 0,3 | 8,8 | 8,4 | 9,1 | 9,3 | 7,3 | 7,4 | 8,4 ± 0,9 |
| **0,195** | 5,9 | 5,9 | 5,5 | 5,9 | 5,3 | 5,2 | 5,6 ± 0,3 | 7,6 | 7,6 | 7,0 | 8,0 | 6,8 | 6,5 | 7,3 ± 0,6 |
| **0,250** | 5,3 | 5,3 | 4,5 | 4,8 | 4,5 | 4,4 | 4,8 ± 0,4 | 6,8 | 7,0 | 5,5 | 7,1 | 6,4 | 5,9 | 6,5 ± 0,7 |
| **0,500** | 3,6 | 3,6 | 3,3 | 2,9 | 3,0 | 3,0 | 3,2 ± 0,3 | 4,9 | 4,8 | 4,7 | 5,0 | 4,8 | 3,7 | 4,7 ± 0,5 |
| **0,781** | 2,8 | 2,9 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,6 ± 0,2 | 3,6 | 4,0 | 3,6 | 3,8 | 3,7 | 3,1 | 3,6 ± 0,3 |
| **1,000** | 2,2 | 2,4 | 1,9 | 2,1 | 2,1 | 2 | 2,1 ± 0,2 | 2,5 | 3,3 | 2,6 | 2,9 | 2,8 | 2,7 | 2,8 ± 0,3 |

Tabla 78: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de la **etapa IIa (cabras gestantes)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por las vías intravenosa e intramuscular.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa** T > CIM (h) / animal | | | | | | | **Vía intramuscular** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **F** | **G** | **J** | **K** | **L** | **M** | **MEDIA ± D.E.** | **F** | **G** | **J** | **K** | **L** | **M** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 7,6 | 9,0 | 7,6 | 5,7 | 9,4 | 8,6 | 8,0 ± 1,3 | 11,2 | 9,5 | 9,3 | 9,2 | 9,6 | 9,5 | 9,7 ± 0,8 |
| **0,195** | 7,1 | 7,8 | 6,6 | 5,0 | 8,5 | 7,3 | 7,1 ± 1,2 | 9,3 | 8,9 | 8,2 | 7,5 | 8,9 | 8,6 | 8,6 ± 0,6 |
| **0,250** | 6,7 | 6,9 | 5,9 | 4,6 | 7,8 | 6,4 | 6,2 ± 1,1 | 8,0 | 8,4 | 7,4 | 6,3 | 8,3 | 7,9 | 7,7 ± 0,8 |
| **0,500** | 5,0 | 4,9 | 3,7 | 2,9 | 3,9 | 3,9 | 4,0 ± 0,8 | 5,4 | 6,5 | 5,4 | 3,8 | 6,4 | 5,4 | 5,5 ± 1,0 |
| **0,781** | 3,6 | 3,9 | 3,3 | 2,2 | 3,5 | 3,2 | 3,3 ± 0,6 | 4,5 | 5,0 | 4,7 | 3,3 | 4,9 | 4,3 | 4,4 ± 0,6 |
| **1,000** | 2,6 | 3,1 | 3,1 | 1,6 | 3,2 | 2,7 | 2,7 ± 0,6 | 3,7 | 3,9 | 4,0 | 3,0 | 3,7 | 3,4 | 3,6 ± 0,4 |

Tabla 79: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de la **etapa IIIa (cabras lactantes)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por las vías intravenosa e intramuscular.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa** T > CIM (h) / animal | | | | | | | **Vía intramuscular** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **E** | **Q** | **R** | **T** | **U** | **Z** | **MEDIA ± D.E.** | **E** | **Q** | **R** | **T** | **U** | **Z** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 7,0 | 7,1 | 7,2 | 7,4 | 5,9 | 6,2 | 6,8 ± 0,6 | 7,6 | 8,5 | 7,7 | 8,0 | 7,2 | 7,9 | 7,8 ± 0,4 |
| **0,195** | 6,3 | 6,1 | 6,3 | 6,3 | 5,5 | 5,7 | 6,1 ± 0,3 | 8,0 | 8,4 | 7,4 | 6,3 | 8,3 | 7,9 | 7,7 ± 0,8 |
| **0,250** | 5,8 | 5,5 | 5,7 | 5,6 | 5,2 | 5,4 | 5,5 ± 0,2 | 6,3 | 6,9 | 6,3 | 6,4 | 6,7 | 7,3 | 6,6 ± 0,4 |
| **0,500** | 3,8 | 3,6 | 3,6 | 3,6 | 3,7 | 3,6 | 3,7 ± 0,1 | 4,7 | 4,9 | 4,7 | 4,4 | 4,7 | 5,0 | 4,7 ± 0,2 |
| **0,781** | 3,1 | 2,9 | 2,6 | 3,0 | 3,1 | 3,0 | 2,9 ± 0,2 | 3,5 | 3,7 | 3,5 | 3,1 | 3,8 | 3,8 | 3,6 ± 0,3 |
| **1,000** | 2,5 | 2,3 | 1,8 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,4 ± 0,3 | 2,6 | 2,8 | 2,6 | 2,0 | 3,1 | 2,8 | 2,7 ± 0,4 |

Tabla 80: Tiempo en horas T > CIM, calculados en leche para cada animal de la **etapa IIIb (cabras lactantes)** luego de administrar 10 mg / medio mamario de cefquinoma por la vía intramamaria.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intramamaria** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **E** | **Q** | **R** | **T** | **U** | **Z** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 60 | 72 | 72 | 72 | 84 | 84 | 74 ± 9 |
| **0,250** | 60 | 72 | 60 | 60 | 60 | 84 | 66 ± 10 |
| **0,800** | 48 | 72 | 60 | 48 | 60 | 72 | 60 ± 11 |

Tabla 81: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de **3 días de edad de la etapa IV (cabritos)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por la vía intravenosa.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa en cabritos de 3 días de edad** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **J** | **A** | **V** | **I** | **E** | **R** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 11,2 | 9,6 | 10,0 | 9,5 | 9,4 | 8,6 | 9,7 ± 0,9 |
| **0,195** | 10,0 | 8,7 | 8,9 | 8,4 | 8,3 | 8,2 | 8,8 ± 0,6 |
| **0,250** | 9,1 | 8,1 | 8,0 | 7,6 | 7,5 | 8,0 | 8,1 ± 0,6 |
| **0,500** | 5,8 | 8,1 | 6,8 | 6,8 | 6,6 | 9,8 | 7,3 ± 1,4 |
| **0,781** | 4,7 | 5,1 | 4,8 | 4,3 | 4,5 | 3,9 | 4,6 ± 0,4 |
| **1,000** | 3,9 | 4,2 | 4,1 | 3,5 | 3,8 | 2,0 | 3,6 ± 0,8 |

Tabla 82: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de **10 días de edad de la etapa IV (cabritos)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por la vía intravenosa.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa en cabritos de 10 días de edad** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **J** | **A** | **V** | **I** | **E** | **R** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 10,3 | 8,6 | 9,7 | 8,6 | 9,2 | 9,6 | 9,3 ± 0,7 |
| **0,195** | 9,1 | 7,8 | 8,0 | 7,7 | 7,8 | 8,8 | 8,2 ± 0,6 |
| **0,250** | 8,2 | 7,2 | 6,8 | 7,0 | 6,8 | 8,3 | 7,4 ± 0,7 |
| **0,500** | 5,5 | 5,6 | 5,0 | 5,2 | 5,2 | 6,4 | 5,5 ± 0,5 |
| **0,781** | 4,2 | 4,8 | 3,9 | 4,2 | 4,0 | 5,1 | 4,4 ± 0,5 |
| **1,000** | 3,2 | 4,2 | 3,0 | 3,3 | 3,2 | 4,0 | 3,5 ± 0,5 |

Tabla 83: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de **24 días de edad de la etapa IV (cabritos)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por la vía intravenosa.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa en cabritos de 24 días de edad** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **J** | **A** | **V** | **I** | **E** | **R** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 7,4 | 7,3 | 5,7 | 5,6 | 5,6 | 7,1 | 6,4 ± 0,9 |
| **0,195** | 6,9 | 6,8 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 6,3 | 5,8 ± 1,0 |
| **0,250** | 6,6 | 6,4 | 4,4 | 4,5 | 4,6 | 4,3 | 5,1 ± 1,1 |
| **0,500** | 5,0 | 4,8 | 3,2 | 3,2 | 3,3 | 3,2 | 3,8 ± 0,9 |
| **0,781** | 4,0 | 3,7 | 2,5 | 2,5 | 2,7 | 3,3 | 3,1 ± 0,6 |
| **1,000** | 3,3 | 2,9 | 1,9 | 2,0 | 2,3 | 2,9 | 2,5 ± 0,6 |

Tabla 84: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de **50 días de edad de la etapa IV (cabritos)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por la vía intravenosa.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa en cabritos de 50 días de edad** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **J** | **A** | **V** | **I** | **E** | **R** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 6,9 | 6,7 | 5,9 | 5,6 | 5,6 | 5,8 | 6,1 ± 0,6 |
| **0,195** | 6,4 | 6,1 | 5,3 | 5,0 | 5,2 | 5,4 | 5,6 ± 0,5 |
| **0,250** | 6,0 | 5,6 | 4,8 | 4,6 | 4,8 | 5,2 | 5,2 ± 0,5 |
| **0,500** | 4,6 | 3,8 | 3,4 | 3,4 | 3,5 | 3,7 | 3,7 ± 0,5 |
| **0,781** | 3,4 | 3,3 | 2,8 | 2,7 | 2,9 | 3,2 | 3,0 ± 0,3 |
| **1,000** | 2,4 | 2,8 | 2,3 | 2,3 | 2,5 | 2,8 | 2,5 ± 0,2 |

Tabla 85: Tiempo en horas T > CIM, calculados para cada animal de **80 días de edad de la etapa IV (cabritos)** luego de administrar 2 mg/kg de cefquinoma por la vía intravenosa.

| **$CIM_{90}$ (µg/ml)** | **Vía intravenosa en cabritos de 80 días de edad** T > CIM (h) / animal | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **J** | **A** | **V** | **I** | **E** | **R** | **MEDIA ± D.E.** |
| **0,120** | 5,5 | 5,9 | 5,7 | 5,7 | 5,8 | 7,2 | 6,0 ± 0,6 |
| **0,195** | 4,9 | 5,4 | 5,2 | 5,3 | 5,4 | 6,4 | 5,4 ± 0,5 |
| **0,250** | 4,4 | 5,0 | 4,9 | 5,0 | 5,2 | 5,7 | 5,0 ± 0,4 |
| **0,500** | 2,9 | 3,1 | 3,5 | 3,6 | 3,7 | 3,8 | 3,4 ± 0,4 |
| **0,781** | 2,4 | 2,5 | 2,9 | 2,9 | 3,2 | 3,4 | 2,9 ± 0,4 |
| **1,000** | 2,4 | 2,5 | 2,9 | 2,9 | 3,2 | 3,4 | 2,9 ± 0,4 |